

PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI ISOLAT BAKTERI *Bacillus licheniformis* TS-17 DAN PEMURNIAN MENGGUNAKAN FRAKSINASI AMONIUM SULFAT DAN KROMATOGRAFI GEL FILTRASI

SKRIPSI

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Studi Kimia**



Oleh:

SITI FATH ANNISA

08031382025097

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
INDRALAYA
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI ISOLAT BAKTERI *Bacillus licheniformis* TS-17 DAN PEMURNIAN MENGGUNAKAN FRAKSINASI AMONIUM SULFAT DAN KROMATOGRAFI GEL FILTRASI

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Studi Kimia

Oleh:

Siti Fath Annisa

08031382025097

Indralaya, 23 Desember 2024

Menyetujui,

Pembimbing

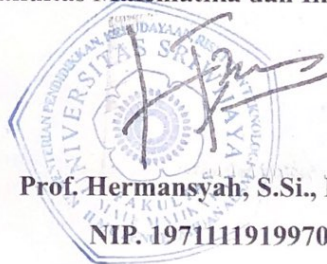


Dr. Heni Yohandini Kusumawati, M.Si.

NIP. 197011152000122004

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph.D.

NIP. 197111191997021001

HALAMAN PERSETUJUAN

Karya tulis ilmiah berupa skripsi dengan judul “Produksi Enzim Protease dari Isolat Bakteri *Bacillus licheniformis* TS-17 dan Pemurnian Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat dan Kromatografi Gel Filtrasi” telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Sidang Sarjana Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada tanggal 18 Desember 2024 dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai masukan yang telah diberikan.

Indralaya, 23 Desember 2024

Ketua:

1. **Dra. Julinar, M. Si.**

NIP. 196507251993032002

()

Anggota:

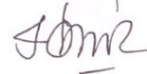
1. **Dr. Ferlinahayati, M.Si.**

NIP. 197402052000032001

()

2. **Dr. Heni Yohandini Kusumawati, M.Si.**

NIP. 197011152000122004

()

Mengetahui,

Dekan FMIPA



Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph.D.

NIP. 197111191997021001

Ketua Jurusan Kimia



Prof. Dr. Muharni, M. Si.

NIP. 196903041994122001

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Siti Fath Annisa

NIM : 08031382025097

Fakultas/Jurusan : MIPA/Kimia

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan karya ilmiah ini belum pernah diajukan sebagai pemenuhan persyaratan untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata (S1) dari Universitas Sriwijaya maupun perguruan tinggi lain. Semua informasi yang dimuat dalam skripsi ini yang berasal dari penulis lain baik yang dipublikasikan atau tidak telah diberikan penghargaan dengan mengutip nama sumber penulis secara benar. Semua isi dari skripsi ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya sebagai penulis.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Indralaya, 23 Desember 2024

Penulis



Siti Fath Annisa

NIM. 08031382025097

**HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademik Universitas Sriwijaya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama mahasiswa : Siti Fath Annisa
NIM : 08031382025097
Fakultas/Jurusan : MIPA/Kimia
Jenis karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sriwijaya “Hak bebas royalti non-eksklusif (*non-exclusively royalty-free right*)” atas karya ilmiah saya yang berjudul “Produksi Enzim Protease dari Isolat Bakteri *Bacillus licheniformis* TS-17 dan Pemurnian Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat dan Kromatografi Gel Filtrasi”. Dengan hak bebas royalti non-eksklusif ini, Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalih, edit/memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir atau skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Indralaya, 23 Desember 2024
Yang Menyatakan,



Siti Fath Annisa
NIM. 08031382025097

HALAMAN PERSEMBAHAN

In the name of Allah, the Most Gracious and the Most Merciful. All praises to Allah Swt. for making it possible for me to finish this paper.

First and foremost, I'd like to dedicate this paper for both of my parent, Ibu and Bapak. Without your love, dedication, and faith, I wouldn't be here to stand tall through all the struggles.

Moreover, I'd like to dedicate this paper to myself for getting it together. All the hardship may have finally paid off. I, am now, surrounded by all the love and joy I never knew I could feel.

Lastly, I'd like to dedicate this paper to all my family, friends, and advisers. Without your encouragement, I would hardly come any closer to this point.

I don't need to mention all the deeds and hardships I've gone through in writing this paper. May everyone share the same joy and excitement I feel during their struggles.

إِنَّهُ عَلِيمٌ بِذَاتِ الصُّدُورِ

“He surely knows what lies in every heart”

(QS. Al-Mulk: 13)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah Swt. yang telah memberikan berkat, rahmat, dan hidayah-Nya bagi seluruh hambah-Nya. Shalawat seiring salam kepada Rasulullah SAW yang menjadi suri tauladan bagi umat-Nya. Berkat ini, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Produksi Enzim Protease dari Isolat Bakteri *Bacillus licheniformis* TS-17 dan Pemurnian Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat dan Kromatografi Gel Filtrasi”. Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya.

Proses penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari berbagai rintangan, mulai dari mencari literatur, penelitian, pengumpulan, dan pengolahan data hingga pada tahap penulisan. Namun, dengan ketabahan, keikhlasan, dan rasa tanggung jawab, skripsi ini dapat diselesaikan. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu **Dr. Heni Yohandini Kusumawati, M.Si.** yang telah memberikan bimbingan, bantuan berupa moril dan material, motivasi, saran, serta petunjuk kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Ellya Zaleha yang selalu ingin meluangkan waktu untuk menemani setiap proses saya, mendengarkan semua curahan hati saya, dan menjadi orang pertama yang percaya akan kemampuan saya.
2. Bapak Joni Heriyanto yang selalu memperjuangkan setiap keinginan saya, ikut andil dalam kegiatan saya di tengah kesibukannya, dan selalu memotivasi saya untuk menjadi lebih baik.
3. Keluarga besar saya yang selalu percaya pada kemampuan saya dan bangga atas setiap pencapaian saya.
4. Bapak Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Dekan FMIPA Universitas Sriwijaya
5. Ibu Prof. Dr. Muharni, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya
6. Ibu Dra. Julinar, M.Si. dan Ibu Dr. Ferlinahayati, M.Si. selaku Dosen Pembahas dan Penguji Sidang Sarjana yang telah memberikan masukan,

kritikan, maupun saran sehingga penulis dapat memperbaiki kesalahan-kesalahan yang terdapat di dalam skripsi.

7. Seluruh Dosen FMIPA Kimia Universitas Sriwijaya yang telah memberikan ilmu dan mendidik selama masa perkuliahan.
8. Staff Laboratorium (Mba Dessy, Yuk Yanti, Yuk Nur, dan Yuk Niar) yang membantu dalam pelengkapan alat dan bahan selama proses penelitian.
9. Mba Novi dan Kak Chosiin yang memberikan informasi, mengurus jadwal, dan membantu proses administrasi.
10. Detti Aisyah Aprillia, sahabat terkasih, yang selalu setia menemani saya, mendengarkan segala keluh kesah saya, bertahan dengan segala sifat saya, dan terus memotivasi saya untuk terus berjuang.
11. Yayang Fortuna Septblensky, sahabat tercinta, yang telah menemani saya sejak awal perkuliahan, membantu proses perkuliahan saya, menjadi teman untuk bertukar cerita, dan memotivasi saya untuk menyelesaikan penelitian ini.
12. Nuraini Ayu Lestari, sahabat tersayang, yang telah menjadi tempat berbagi suka duka selama penelitian, menemani proses perkuliahan, dan menjadi teman untuk berbagi hobi.
13. Dita dan Vio yang selalu menemani setiap kegiatan selama perkuliahan dan penelitian serta menjadi teman untuk berbagi cerita dan hobi.
14. Felle dan Egin yang tetap meluangkan waktu untuk berkabar dan bertemu di tengah kesibukan serta menjadi penyemangat untuk menyelesaikan penelitian ini.
15. Teman SMA (Nuha, Manda, Desi, Pricha, Ismi, Maida, Tata, dan Shakila) yang tetap meluangkan waktu untuk bertemu dan bangga atas setiap pencapaian.
16. Teman Seperjuangan TA (Citra, Maria, Zaharo, Novta, Indah, Pithri, Ira, Zahra, Eva, Almer, Rafly, dan Husnil) yang menjadi penyemangat dan menemani proses penelitian serta penyusunan skripsi hingga saat ini.
17. Teman Balapan (Moli, Nazila, Thorik, Derry, dan Dimas) yang menemani proses perkuliahan dan tempat berbagi cerita.

18. Kak Aini, kasuh, yang selalu mendoakan hal-hal baik dan terus bangga atas setiap pencapaian dan Fahry serta Fia, desuh, yang selalu menyemangati dan memberikan doa terbaik.
19. Para asisten Biokimia 1, Biokimia 2, Kimia Anorganik 2, Kimia Organik 2, dan Spektrofotometri yang meluangkan waktu untuk berbagi ilmu dan membantu saya belajar banyak hal.
20. Teman-teman kimia Angkatan 20 yang sudah menjadi tempat berbagi suka duka selama ini.

Semoga bimbingan, ilmu, bantuan, dan masukan yang diberikan kepada penulis menjadi amal jariah dan bernilai pahala di sisi Allah Swt. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan kesalahannya sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca. Akhir kata, penulis mengucapkan terima kasih dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua orang serta pengembangan ilmu kimia dasar yang akan datang.

Indralaya, 23 Desember 2024

Penulis



Siti Fath Annisa

NIM. 08031382025097

SUMMARY

PRODUCTION OF PROTEASE ENZYME FROM BACTERIA *Bacillus licheniformis* TS-17 ISOLATE AND PURIFICATION USING AMMONIUM SULFATE FRACTIONATION GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY

Siti Fath Annisa: Supervised by Dr. Heni Yohandini Kusumawati, M.Si.
Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University.
xvii + 76 pages, 5 tables, 14 figures, 13 appendices.

Protease is an enzyme that can catalyze hydrolysis reactions to break down protein molecules into peptides and amino acids. Microorganisms, such as fungi, yeast, and bacteria can produce proteases. One of the bacteria that can produce protease is *Bacillus licheniformis* TS-17 isolated from the Tanjung Sakti Lahat Hot Springs. The protease produced was a thermostable protease resistant to high temperatures and pH so it is useful for the leather industry. This study carried out purifying enzymes using ammonium sulfate fractionation and gel filtration chromatography, expressing the extracellular protein profile using SDS-PAGE, and determining the enzyme activity towards substrates using zymography.

B. licheniformis TS-17 was grown on chicken feather waste and skim milk. After the enzymes from both media were produced, activity tests with the Folin-Ciocalteu reagent and determination of protein concentration with the Bradford reagent were carried out to compare the specific activities of the enzymes from both media. Chicken feather waste media enzymes with higher specific activity go through the first purification stage in the form of ammonium sulfate fractionation. After the fraction with the highest specific activity was identified as a result of ammonium sulfate fractionation, the fraction was subjected to a second stage of purification in the form of gel filtration chromatography. Crude extracts of chicken feather waste media enzymes, crude extracts of skim milk enzymes, enzymes resulting from ammonium sulfate fractionation, and enzymes resulting from gel filtration chromatography purification were characterized for their protein profile using SDS-PAGE and their activity towards casein using Zymography.

This study showed that the crude extract of chicken feather waste media enzymes had a higher specific activity of 2.5541 U/mg compared to the crude extract of skim milk media enzymes of 2.1326 U/mg. Fraction 3 from ammonium sulfate had the highest specific activity of 6.0264 U/mg. Fraction 6 from gel filtration chromatography had the highest specific activity of 6.7137 U/mg. The purity of fraction 3 by ammonium sulfate fractionation increased by 1.88 times from its crude extract and fraction 6 by gel filtration chromatography increased by 2.09 times from its crude extract. Extracellular protein profile expressed by *B. licheniformis* TS-17 in chicken feather waste media is not the same as in skim milk media. The proteins expressed by *B. licheniformis* TS-17 in the crude enzyme extract, the enzyme after ammonium sulfate fractionation, and the enzyme after gel filtration chromatography have protease activity against casein, but the proteins' sizes differ.

Keywords: *Bacillus licheniformis* TS-17, Chicken Feather Medium, Skim Milk Medium, Gel Filtration Chromatography, SDS-PAGE, Zymography

RINGKASAN

PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI ISOLAT BAKTERI *Bacillus licheniformis* TS-17 DAN PEMURNIAN MENGGUNAKAN FRAKSINASI AMONIUM SULFAT DAN KROMATOGRAFI GEL FILTRASI

Siti Fath Annisa: Dibimbing oleh Dr. Heni Yohandini Kusumawati, M.Si.
Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya
xvii + 76 halaman, 5 tabel, 14 gambar, 13 lampiran.

Protease merupakan enzim yang mengatalis reaksi hidrolisis untuk pemecahan molekul protein menjadi peptida dan asam amino. Mikroorganisme, seperti jamur, *yeast*, dan bakteri, dapat memproduksi protease. Salah satu bakteri yang dapat digunakan untuk memproduksi protease adalah *Bacillus licheniformis* TS-17 yang diisolasi dari Sumber Air Panas Tanjung Sakti Lahat. Protease yang diproduksi merupakan protease termostabil yang tahan terhadap suhu dan pH tinggi sehingga berguna untuk industri kulit. Pemurnian enzim menggunakan fraksinasi amonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi, pengekspresian profil protein ekstraseluler menggunakan SDS-PAGE, dan penentuan aktivitas enzim terhadap substrat menggunakan Zimografi telah dilakukan pada penelitian ini.

B. licheniformis TS-17 ditumbuhkan pada media limbah bulu ayam dan susu skim. Setelah enzim dari kedua media diproduksi, uji aktivitas dengan reagen Folin-Ciocalteu dan penentuan kadar dengan reagen Bradford dilakukan untuk membandingkan aktivitas spesifik enzim dari kedua media. Enzim media limbah bulu ayam dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi melalui tahap pemurnian pertama berupa fraksinasi amonium sulfat. Setelah diketahui fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi hasil fraksinasi amonium sulfat, fraksi tersebut dilakukan pemurnian tahap kedua berupa kromatografi gel filtrasi. Ekstrak kasar enzim media limbah bulu ayam, ekstrak kasar enzim media susu skim, enzim hasil fraksinasi amonium sulfat, dan enzim hasil pemurnian kromatografi gel filtrasi dikarakterisasi profil protein menggunakan SDS-PAGE dan aktivitasnya terhadap kasein menggunakan Zimografi.

Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak kasar enzim media limbah bulu ayam memiliki aktivitas spesifik lebih tinggi sebesar 2,5541 U/mg dibandingkan ekstrak kasar enzim media susu skim sebesar 2,1326 U/mg. Fraksi 3 hasil amonium sulfat memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 6,0264 U/mg. Fraksi 6 hasil kromatografi gel filtrasi memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 6,7137 U/mg. Kemurnian fraksi 3 hasil fraksinasi amonium sulfat meningkat sebanyak 1,88 kali lipat dari ekstrak kasarnya dan fraksi 6 hasil kromatografi gel filtrasi meningkat sebanyak 2,09 kali lipat. Profil protein-protein ekstraseluler yang diekspresikan *B. licheniformis* TS-17 pada media limbah bulu ayam tidak sama dengan media susu skim. Protein-protein yang diekspresikan *B. licheniformis* TS-17 pada ekstrak kasar enzim, enzim setelah fraksinasi amonium sulfat, dan enzim setelah kromatografi gel filtrasi memiliki aktivitas protease terhadap kasein, tetapi ukuran protein yang dihasilkan berbeda.

Kata Kunci: *Bacillus licheniformis* TS-17, Media Limbah Bulu Ayam, Media Susu Skim, Kromatografi Gel Filtrasi, SDS-PAGE, Zimografi

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH	iii
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
SUMMARY	ix
RINGKASAN	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Protein	5
2.2 Enzim Protease.....	7
2.3 Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Protease	8
2.4 Faktor yang Mempengaruhi Produksi Enzim	9
2.5 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	11
2.6 Uji Aktivitas Protease	12
2.7 Penentuan Kadar Protein.....	15
2.8 Pengendapan Protein Menggunakan Amonium Sulfat	16
2.9 Dialisis	17
2.10 Kromatografi Gel Filtrasi.....	19
2.11 SDS-PAGE.....	20
2.12 Zimografi	25
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	27
3.1 Waktu dan Tempat.....	27
3.2 Alat dan Bahan.....	27

3.2.1	Alat	27
3.2.1.1	Alat-alat.....	27
3.2.1.2	Instrumen	27
3.2.2	Bahan.....	27
3.3	Prosedur Penelitian	28
3.3.1	Sterilisasi Alat yang Digunakan	28
3.3.2	Pembuatan Media	28
3.3.2.1	Media Nutrient Agar (NA).....	28
3.3.2.2	Media Nutrient Broth (NB).....	28
3.3.2.3	Media Starter.....	29
3.3.2.4	Media Produksi	29
3.3.3	Peremajaan Bakteri <i>Bacillus licheniformis</i> TS-17.....	30
3.3.4	Produksi Enzim Protease	30
3.3.5	Uji Aktivitas Enzim Protease.....	30
3.3.5.1	Penentuan Absorbansi Larutan Standar Tirosin..	30
3.3.5.2	Penentuan Aktivitas Enzim Protease	31
3.3.6	Penentuan Kadar Protein	31
3.3.6.1	Penentuan Absorbansi Larutan Standar Bovine Serum Albumin (BSA).....	31
3.3.6.2	Penentuan Kadar Protein dengan Metode Bradford	32
3.3.7	Fraksinasi Menggunakan Amonium Sulfat	32
3.3.8	Dialisis	33
3.3.8.1	Preparasi Membran Selofan.....	33
3.3.8.2	Proses Dialisis.....	33
3.3.9	Pemurnian Menggunakan Kromatografi Gel Filtrasi	33
3.3.9.1	Preparasi Kolom Sephacryl S-200 HR	33
3.3.9.2	Proses Kromatografi Gel Filtrasi	34

3.3.10	Karakterisasi Menggunakan SDS-PAGE.....	34
3.3.10.1	Preparasi Lempeng.....	34
3.3.10.2	Pembuatan Separating Gel.....	34
3.3.10.3	Pembuatan Stacking Gel	35
3.3.10.4	Preparasi Sampel.....	35
3.3.10.5	Proses Elektroforesis.....	36
3.3.10.6	Pewarnaan Menggunakan Coomassie Brilliant Blue	36
3.3.11	Zimografi	36
3.3.11.1	Pembuatan Resolving Gel.....	36
3.3.11.2	Pembuatan Stacking Gel	37
3.3.11.3	Preparasi Sampel.....	37
3.3.11.4	Proses Elektroforesis.....	37
3.3.11.5	Pewarnaan Gel	38
3.4	Analisis Data.....	38
3.4.1	Penentuan Kadar Tirosin dan Kadar Protein	38
3.4.2	Penentuan Aktivitas Enzim Protease.....	38
3.4.3	Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Protease.....	39
3.4.4	Penentuan Tingkat Kemurnian Enzim.....	39
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1	Perbandingan Aktivitas Enzim di Setiap Tahap Pemurnian.....	40
4.1.1	Perbandingan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Media Limbah Bulu Ayam dan Susu Skim	40
4.1.2	Perbandingan Aktivitas Enzim Sebelum dan Sesudah Pemurnian Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat	41
4.1.3	Perbandingan Aktivitas Enzim Fraksi-Fraksi Hasil Kromatografi Gel Filtrasi.....	42
4.1.4	Perbandingan Peningkatan Kemurnian Enzim di Setiap Tahap Pemurnian.....	43
4.2	Perbandingan Hasil SDS-PAGE Enzim Media Limbah Bulu Ayam dan Susu Skim	44

4.3 Perbandingan Hasil Zimografi Enzim Media Limbah Bulu Ayam dan Susu Skim	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50
LAMPIRAN	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur tirosin (Berg <i>et al.</i> , 2012)	6
Gambar 2. Reaksi reagen Folin-Ciocalteu terhadap tirosin (Kavitha <i>et al.</i> , 2020; Maulidah & Yuanita, 2022).....	14
Gambar 3. Formasi kompleks pewarna protein (Sherovski <i>et al.</i> , 2018).....	16
Gambar 4. Proses dialisis (Berg <i>et al.</i> , 2012).....	18
Gambar 5. Proses kromatografi gel filtrasi (Berg <i>et al.</i> , 2012).....	20
Gambar 6. Reaksi polimerisasi pembentukan gel poliakrilamida (Hermanson, 2013)	21
Gambar 7. (a) Struktur TEMED (b) Struktur APS (Ziminska <i>et al.</i> , 2020).....	21
Gambar 8. Prosedur kromatografi gel filtrasi (Berg <i>et al.</i> , 2012).....	22
Gambar 9. Reaksi pemutusan ikatan disulfida oleh DTT (Hermanson, 2013) ..	23
Gambar 10. Reaksi pemutusan ikatan disulfida oleh 2-merkaptotanol (Hermanson, 2013).....	23
Gambar 11. Proses denaturasi oleh SDS (Drabik <i>et al.</i> , 2013).	24
Gambar 12. Hasil SDS-PAGE ekstrak kasar enzim dan hasil fraksinasi amonium sulfat	45
Gambar 13. Hasil Zimografi ekstrak kasar enzim dan hasil fraksinasi amonium sulfat	46
Gambar 14. Hasil Zimografi fraksi-fraksi hasil kromatografi gel filtrasi	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Data pengukuran diameter zona dan indeks proteolitik bakteri termofilik isolat Sumber Air Panas Tanjung Sakti penghasil enzim protease (Rini, 2022).....	9
Tabel 2. Data perbandingan aktivitas dan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim media limbah bulu ayam dan susu skim	40
Tabel 3. Data perbandingan kadar tirosin, aktivitas, kadar protein, aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim media limbah bulu ayam dan enzim hasil fraksinasi amonium sulfat	41
Tabel 4. Data perbandingan kadar tirosin, aktivitas, kadar protein, dan aktivitas spesifik fraksi enzim hasil pemurnian kromatografi gel filtrasi	42
Tabel 5. Perbandingan tingkat kemurnian ekstrak kasar enzim media limbah bulu ayam, hasil fraksinasi amonium sulfat, dan fraksi 6 hasil kromatografi gel filtrasi	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Skema Kerja	58
Lampiran 2. Pembuatan Larutan	60
Lampiran 3. Perhitungan Volume Laju Alir	61
Lampiran 4. Tabel Penambahan Amonium Sulfat	62
Lampiran 5. Fraksinasi Amonium Sulfat	63
Lampiran 6. Pembuatan Kurva Standar Tirosin	64
Lampiran 7. Pengukuran Absorbansi Aktivitas Enzim Larutan Enzim di Setiap Tahap	65
Lampiran 8. Perhitungan Kadar Tirosin dan Aktivitas Enzim Larutan Enzim di Setiap Tahap	66
Lampiran 9. Pembuatan Kurva Standar BSA	68
Lampiran 10. Pengukuran Absorbansi Kadar Protein Larutan Enzim di Setiap Tahap	69
Lampiran 11. Perhitungan Kadar Protein Larutan Enzim dan Aktivitas Spesifik di Setiap Tahap	70
Lampiran 12. Perhitungan Tingkat Kemurnian Larutan Enzim di Setiap Tahap	72
Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian	73

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Protease diketahui sebagai enzim yang banyak terdapat di alam yang mampu mengatalis reaksi hidrolisis untuk pemecahan molekul protein menjadi peptida dan asam amino. Protease termasuk klasifikasi *Enzyme Commission* (EC) kelas 3 (hidrolase) dan sub-grup 4 (penghidrolisis ikatan peptida) (Sharma *et al.*, 2017). Protease dapat ditemukan dari berbagai sumber, seperti tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Protease mikroba lebih dipilih dibandingkan sumber lain karena biaya produksi yang lebih murah dan menggunakan sumber daya terbarukan. Umumnya, protease mikroba diproduksi oleh bakteri, jamur, dan kapang. Spesies *Bacillus* diketahui sebagai salah satu jenis bakteri yang memiliki kemampuan untuk memproduksi protease ekstraseluler tertentu selama fase setelah eksponensial dan stasioner. Berbagai spesies *Bacillus*, seperti *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, dan *Bacillus lentus* diketahui dapat memproduksi protease (Pouryafar *et al.*, 2015).

B. licheniformis diketahui sebagai bakteri Gram positif yang sering dijumpai di tanah dan bulu unggas. Beberapa penelitian mengindikasikan bakteri ini tumbuh dengan baik pada kondisi alkali (basa) dan memproduksi enzim protease termotabil yang tetap stabil pada pH tinggi. Sifat enzimatik ini cocok untuk aplikasi industri, seperti tambahan dalam deterjen dan dalam industri kulit sehingga protease industri yang dihasilkan *B. licheniformis* digunakan sebagai agen pembersih dalam deterjen (Pouryafar *et al.*, 2015). Protease diketahui sebagai alternatif yang ramah lingkungan untuk meningkatkan kualitas kulit, membantu mengurangi limbah, dan menghemat waktu dan energi. Penggunaan protease alkali dengan kalium hidroksida dan natrium klorida selama proses *dehairing* dan *dewooling* dapat mengurangi limbah pembuangan (Singh *et al.*, 2016).

Pemurnian protein diketahui sebagai proses *multi-step* yang memanfaatkan karakteristik biokimia dan biofisika protein target, seperti sumbernya, konsentrasinya, kelarutan, muatan, dan sifat hidrofobik. Idealnya, pemurnian digunakan untuk mendapatkan *recovery* semaksimal mungkin dari

protein yang diinginkan, tetapi kehilangan aktivitas seminimal mungkin. Protein diketahui sebagai molekul yang rapuh dan dapat terdenaturasi dengan mudah pada suhu dan pH yang ekstrim. Metode yang digunakan untuk pemurnian protein harus ringan serta menjaga konformasi molekul dan bioaktivitasnya. Jika dibutuhkan, beberapa tahap dapat digabungkan berurutan tanpa prosedur tambahan antar tahap, seperti: Presipitasi garam > Gel filtrasi > Kromatografi penukar ion (Rosenberg, 2005).

Presipitasi menggunakan amonium sulfat diketahui sebagai teknik yang digunakan sebagai tahap awal dalam skema pemurnian. Presipitasi protein menggunakan amonium sulfat dicapai dengan penghilang kadar air di sekitar molekul protein. Molekul air dalam jumlah yang banyak berikatan dengan ion sulfat (SO_4^{2-}) dalam larutan, mengurangi kadar air yang akan berinteraksi dengan molekul protein. Kromatografi gel filtrasi dikenal juga sebagai pemisahan molekul, permeasi gel, dan kromatografi eksklusi ukuran atau *Size Exclusion Chromatography* (SEC). Tujuan utama gel filtrasi adalah pemisahan molekul berdasarkan ukuran secara cepat. Gel filtrasi bisa digunakan untuk menghilangkan garam dari larutan protein dan juga mengganti buffer (Rosenberg, 2005).

Berat molekul protein merupakan salah satu ciri yang dapat digunakan untuk identifikasi protein. Berat molekul protein ditentukan dengan menghitung berat molekul total asam amino penyusun protein. Metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel* (SDS-PAGE) dapat digunakan untuk menentukan berat molekul protein dengan membandingkan pergerakan elektroforesis protein target dengan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya (Rosenberg, 2005). Metode SDS-PAGE memisahkan molekul protein berdasarkan bentuk, ukuran, dan berat molekulnya. Metode ini dapat menunjukkan protein mana yang konsentrasinya lebih banyak, berat molekul dari masing-masing pita protein, dan kandungan protein pada masing-masing pita protein (Masyitoh *et al.*, 2016). Zimografi juga dapat digunakan untuk menentukan berat molekul protein. Teknik ini telah banyak digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi protease. Teknik ini memberikan analisis yang sensitif, terukur, dan fungsional menggunakan gel elektroforesis dalam kondisi denaturasi non-reduksi. Maka dari itu, zimografi memungkinkan untuk memperkirakan aktivitas proteolitik protease berdasarkan

degradasi substrat tertentu serta identifikasi berdasarkan berat molekul (Monte *et al.*, 2017).

Sebelumnya, (Rini, 2022) telah melakukan penelitian mengenai perbandingan aktivitas enzim protease dari isolat bakteri *B. licheniformis* TS-17 pada media limbah bulu ayam dan susu skim sehingga diketahui aktivitas enzim pada media limbah bulu ayam lebih tinggi dibandingkan enzim pada media susu skim. Maka dari itu, pemurnian enzim pada penelitian ini dilakukan pada media limbah bulu ayam. Pemurnian dilakukan menggunakan fraksinasi amonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul. Hasil pemurnian ini dibandingkan dengan ekstrak kasarnya menggunakan uji aktivitas dan penentuan kadar protein. Selanjutnya, ekstrak kasar enzim media limbah bulu ayam dan ekstrak kasar enzim dari susu skim dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE dan Zimografi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana peningkatan kemurnian enzim protease dari media limbah bulu ayam setelah proses pemurnian menggunakan fraksinasi amonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi?
2. Apakah protein-protein ekstraseluler yang diekspresikan oleh *B. licheniformis* pada media limbah bulu ayam dan media susu skim memiliki profil protein yang sama?
3. Apakah protein-protein ekstrak kasar enzim dan enzim setelah pemurnian merupakan protein yang memiliki aktivitas protease terhadap kasein?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan peningkatan kemurnian enzim protease dari media limbah bulu ayam setelah proses pemurnian dengan fraksinasi amonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi.
2. Membandingkan profil pita protein enzim media limbah bulu ayam dan enzim media susu skim pada elektroforegram SDS-PAGE.
3. Menganalisis protein-protein ekstrak kasar enzim media susu skim, ekstrak kasar enzim media limbah bulu ayam, dan enzim hasil

pemurnian yang memiliki aktivitas protease terhadap kasein menggunakan metode Zimografi.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi mengenai pemurnian protease dari media limbah bulu ayam menggunakan fraksinasi amonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi.
2. Memberikan informasi mengenai perbandingan pita-pita protein ekstraseluler enzim media susu skim dan limbah bulu ayam menggunakan SDS-PAGE.
3. Menjadi acuan penggunaan Zimografi untuk identifikasi aktivitas enzim protease terhadap kasein.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S. (2023). Protein Profile Analysis of Tungro and Dwarf Virus-Infected Rice Plants Using SDS-PAGE. *Jurnal Biologi Tropis*. 23(2): 178–186.
- Abd-ElKhalek, A. M., Seoudi, D. M., Ibrahim, O. A., Abd-Rabou, N. S., & Abd ElAzeem, E. M. (2020). Extraction, Partial Purification, Characteristics, and Antimicrobial Activity of Plant Protease from *Moringa oleifera* Leaves. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 7(4): 243–250. <https://doi.org/10.30491/jabr.2020.230789.1225>
- Ahmed, G. M., Husain, A. A., & Al-Jumaili, E. F. A. (2022). Purification and Characterization of Protease by *Bacillus subtilis* Isolated from Soil. *Biochem. Cell. Arch.*. 22(1): 2589–2590.
- Astriany, D., Hamdani, S., & Wilianto, H. (2022). Produksi Enzim Protease *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* Hasil Isolasi dari Lumpur Kubangan Babi dengan Variasi Substrat Putih Telur. *Prosiding Seminar Nasional Diseminasi*. 2(1): 338–343.
- Astuti, A., Liviawaty, E., & Subiyanto. (2021). Pengaruh Penambahan Susu Skim Bubuk Terhadap Tingkat Kesukaan Bakso Ikan Nila. *Jurnal Akuatek*. 2(2): 95–103.
- Athallah, & Sugesti. (2020). Uji Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus epidermis* Menggunakan Ekstrak Etanol dari Simplisia Kering Bawang Putih (*Allium sativum* L.). *Jurnal Education and Development*. 8(2): 375–380.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2012). *Biochemistry: Seventh Edition*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Biswas, A. K., Tandon, S., & Mandal, P. K. (2020). Calpain-assisted Postmortem Aging of Meat and Its Detection Methods. In A. K. Biswas & P. K. Mandal (Eds.), *Meat Quality Analysis: Advanced Evaluation Methods, Techniques, and Technologies* (pp. 101–114). Chennai: Elsevier Inc.
- Buxbaum, E. (2015). *Fundamentals of Protein Structure and Function: Second Edition*. Kevelaer: Springer International Publishing.
- Dalle, N. S., Tukan, H. D., & Nugraha, E. Y. (2022). Perbandingan Nilai Nutrisi Antara Tepung Bulu Broiler dan Tepung Bulu Broiler Terfermentasi. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 10(3): 92–100.
- Desai, S. A., Patel, V. P., & Patel, D. V. (2015). Production and Purification of Pharmaceutically Important Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* Species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 7(6): 493–497.
- Drabik, A., Bodzon-Kulakowska, A., & Silberring, J. (2013). Gel Electrophoresis. In P. Ciborowski & J. Silberring (Eds.), *Proteomic Profiling and Analytical*

Chemistry (pp. 107–133). Netherlands: Elsevier B.V.

- Dzulqaidah, I., Zanuba, R. B., Alwi, A. S. F., Salsabila, A. R. P., Mursidi, S., & Muliastuti, H. (2021). Ekstraksi dan Uji Aktivitas Enzim Bromelin Kasar dari Buah Nanas. *Journal of Agritechology and Food Processing*. 1(2): 80–84. <https://doi.org/10.31764/jafp.v1i2.6974>
- Emawati, E., Idar, Kurnia, D., & Amelia, S. (2015). Deteksi Protein Alergen Prealbumin pada Ikan Tongkol Menggunakan Kromatografi Filtrasi Gel G-50 dan SDS-Page. *Jurnal Farmasi Galenika*. 5(3): 122–130.
- Ferdiani, D., Zilda, D. S., Afriansyah, M. A., & Ethica, S. N. (2023). Characteristics and Substrate Specificity of Semi-Purified Bacterial Protease of *Bacillus thuringiensis* HSFI-12 with Potential as Antithrombotic Agent. *Science and Technology Indonesia*. 8(1): 9–16. <https://doi.org/10.26554/sti.2023.8.1.9-16>
- Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A Systematic Reconsideration on Proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*. 128(2019): 254–267.
- Hamza, T. A. (2017). Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*. 3(1): 1–10.
- Hapsari, M. W., Anggraeni, N., Rohana, L., Lanywati, E., Kusumaningtyas, N., & Wuryanti. (2021). Isolasi, Purifikasi Parsial, dan Karakterisasi Enzim L-Asparaginase dari Bawang Putih (*Allium sativum*). *Science, Technology, and Management Journal*. 1(2): 71–79.
- Herlina, N., Mustopa, A. Z., Surachma, R. S., Triratna, L., Kartina, G., & Alfisyahrin, W. N. (2019). Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Peptida Susu Kambing Hasil Hidrolisis dengan Protease *Lactobacillus plantarum* S31. *Jurnal Biologi Indonesia*. 15(1): 23–31.
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques*. Netherlands: Elsevier Inc.
- Ilmiah, S. N., Mubarik, N. R., & Wahyuntari, B. (2018). Characterization of Protease from *Bacillus licheniformis* F11.1 as a Bio-Detergent Agent. *Makara Journal of Science*. 22(3): 105–112.
- Istini, I. (2020). Pemanfaatan Plastik Polipropilen Standing Pouch sebagai Salah Satu Kemasan Sterilisasi Peralatan Laboratorium. *Indonesian Journal of Laboratory*. 2(3): 41–46. <https://doi.org/10.22146/ijl.v2i3.57424>
- Kapalka, G. M. (2010). *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents*. New Jersey: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374927-7.00019-4>
- Kavitha, C., Bramhaiah, K., & John, N. S. (2020). Low-cost Electrochemical

- Detection of L-tyrosine Using an rGO-Cu Modified Pencil Graphite Electrode and Its Surface Orientation on a Ag Electrode Using an: Ex Situ Spectroelectrochemical Method. *RSC Advances*. 10(39): 22871–22880. <https://doi.org/10.1039/d0ra04015k>
- Kong, D. Y. C., Gerontas, S., McCluckie, R. A., Mewies, M., Gruber, D., & Titchener-Hooker, N. J. (2018). Effects of Bed Compression on Protein Separation on Gel Filtration Chromatography at Bench and Pilot Scale Darryl. *J Chem Technol Biotechnol*. 93(7): 1959–1965.
- Kotlar, C., Ponce, A., & Roura, S. (2015). Characterization of a Novel Protease from *Bacillus cereus* and Evaluation of an Eco-friendly Hydrolysis of a Brewery Byproduct. *Journal of the Institute of Brewing*. 121(1): 558–565. <https://doi.org/10.1002/jib.257>
- Kurniawan, E., Ginting, Z., & Nurjannah, P. (2017). Pemanfaatan Urine Kambing pada Pembuatan Pupuk Organik Cair Terhadap Kualitas Unsur Hara Makro (NPK). *Seminar Nasional Sains dan Teknologi*. 1(1): 1–10.
- Li, Z., Huang, X., Tang, Q., Ma, M., Jin, Y., & Sheng, L. (2022). Functional Properties and Extraction Techniques of Chicken Egg White Proteins. *Foods*. 11(1): 1–19. <https://doi.org/10.3390/foods11162434>
- Machsun, I. R., & Zulaika, E. (2017). Profil Protein Bakteri Ureolitik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 6(2): 1–3. <https://doi.org/10.12962/j23373520.v6i2.25813>
- Mahdiyah, D. (2015). Isolasi Bakteri dari Tanah Gambut Penghasil Enzim Protease. *Jurnal Pharmascience*. 2(2): 71–79.
- Mamun, M. A. Al, Mian, M. M., Saifuddin, M., Khan, S. N., & Hoq, M. M. (2017). Optimization of Fermenting Medium by Statistical Method for Production of Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis* MZK05M9. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 5(6): 24–28.
- Masyitoh, M. D., Dewanti, I. D. A. R., & Setyorini, D. (2016). Analisis Profil Protein Ekstrak Aquades dan Etanol Daun Mimba (*Azadirachta Indica A. Juss*) dengan Metode SDS-PAGE. *J Pustaka Kes*. 4(3): 533–539.
- Mathew, C. D., & Gunathilaka, R. M. S. (2015). Production, Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Serine Protease from *Bacillus licheniformis* NMS-1. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*. 6(3): 19–27.
- Maulidah, E. Y., & Yuanita, L. (2022). Pengaruh Pemberian Sirup Prebiotik Umbi Yakon Terhadap Aktivitas Enzim Pencernaan pada Duodenum *Rattus norvegicus*. *UNESA Journal of Chemistry*. 11(1): 1–8.
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas*

- hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology*. 2017(1): 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/6943952>
- Monte, J. F. S., Moreno, C. J. G., Monteiro, J. P. M. F. L., Rocha, H. A. de O., Ribeiro, A. R., & Silva, M. S. (2017). Use of Zymography in Trypanosomiasis Studies. In J. Wilkesman & L. Kurz (Eds.), *Zymography: Methods and Protocols* (pp. 213–220). Hatfield: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_20
- Mulyaningtyas, D., Purwantisari, S., Kusdiyantini, E., & Suryadi, Y. (2016). Produksi Kitosan Secara Enzimatis oleh *Bacillus firmus* E65 untuk Pengendalian Penyakit Antraknosa pada Buah Mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Biologi*, 5(4), 8–17.
- Narwal, V., Sharma, N., Sharma, R., Rajput, Y. S., & Mann, B. (2018). Applicability of Protein Estimation Methods for Assaying Glycomacropptide. *International Journal of Dairy Technology*. 71(2): 539–543. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12452>
- Nouroozi, R. V., Noroozi, M. V., & Ahmadizadeh, M. (2015). Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay. *International Electronic Journal of Medicine*. 4(1): 11–17. <https://doi.org/10.31661/iejm158>
- Nuritasari, D., Sarjono, P. R., & Aminin, A. L. N. (2017). Isolasi Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gedongsongo dengan Media Pengaya MB (Minimal Broth) dan TS (Taoge Sukrosa) serta Identifikasi Fenotip dan Genotip. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 20(2): 84–91.
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., & O'Connor, B. F. (2017). Gel-Filtration Chromatography. In D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3>
- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 71(1): 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- Pico, J., Pismag, R. Y., Laudouze, M., & Martinez, M. M. (2020). Systematic Evaluation of the Folin-Ciocalteu and Fast Blue BB Reactions During the Analysis of Total Phenolics in Legumes, Nuts and Plant Seeds. *Food and Function*. 11(11): 9868–9880. <https://doi.org/10.1039/d0fo01857k>
- Pouryafar, F., Najafpour, G. D., Noshadi, N., & Jahanshahi, M. (2015). Thermostable Alkaline Protease Production via Solid State Fermentation in a Tray Bioreactor Using *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. *International*

Journal of Environmental Research. 9(4): 1127–1134.

- Ratnayani, O., Yulianthi, P. E., & Wirajana, I. N. (2021). Pemurnian Amilase Mikroba Amilolitik dengan Fraksinasi Amonium Sulfat dan Amobilisasi pada Agar-Agar Komersial. *Jurnal Kimia*. 8(1): 1–9. <https://doi.org/10.24843/jchem.2021.v15.i01.p07>
- Ravera, S., & Panfoli, I. (2017). Simultaneous Detection of Activity and Relative Molecular Mass Mass of Adenylate Kinases After SDS-PAGE and Blotting. In J. Wilkesman & L. Kurz (Eds.), *Zymography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 229–251). Hatfield: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4>
- Razavi, B. S., Zhang, X., Bilyera, N., Guber, A., & Zarebanadkouki, M. (2019). Soil Zymography: Simple and reliable? Review of Current Knowledge and Optimization of the Method. *Rhizosphere*. 11(2019): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100161>
- Rini, B. F. (2022). *Skrining Bakteri Proteolitik, Pemurnian Parsial, dan Karakterisasi Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Sumber Air Panas Tanjung Sakti Lahat*. Skripsi. Universitas Sriwijaya. Indralaya.
- Risna, Y. K., Sri-Harimurti, Wihandoyo, & Widodo. (2022). Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*. 24(1): 1–7. <https://doi.org/10.25077/jpi.24.1.1-7.2022>
- Rosenberg, I. M. (2005). *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*. Boston: Birkhauser.
- Runtuboi, D. Y. P., Gunaedi, T., Simonapendi, M., & Pakpahan, N. N. L. (2018). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas di Moso Distrik Muara Tami Kota Jayapura Provinsi Papua. *Jurnal Biologi Papua*. 10(2): 68–73. <https://doi.org/10.31957/jbp.474>
- Sharma, K., & Bhattacharyya, D. (2017). Reverse Zymography: Overview and Pitfalls. In J. Wilkesman & L. Kurz (Eds.), *Zymography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1626, pp. 125–132). Hatfield: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_11
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A. (2017). Microbial Alkaline Proteases: Optimization of Production Parameters and Their Properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15(1): 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>
- Shehzad, M., Ali, T., Bibi, N., & Shafique, S. (2022). A Comprehensive Review on Preparation of Pure Immunoglobulins Authors. *International Journal of Natural Medicine and Health Sciences*. 2(1): 48–55.
- Sherovski, P., Stojković, G., & Ristovska, N. (2018). Development, Validation and

- Application of First Derivative Spectroscopy Ratio Method for Estimation of Bradford Assay. *Analytical Biochemistry*. 558(1): 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.07.027>
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*. 21(1): 1–19.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial Proteases in Commercial Applications. *J Pharm Chem Biol Sci*. 4(3): 365–374.
- Soeka, Y. S., & Sulistiani. (2017). Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Stenotrophomonas* sp. Asal Gunung Bromo, Jawa Timur. *Jurnal Ilmu-ilmu Hayati*. 16(2): 203–211.
- Sumarlan, S. H., Wibisono, Y., Hawa, L. C., & Nurwindi, L. L. (2017). Pengaruh Penambahan Enzim Papain Komersial dalam Pembuatan Hidrosilat Protein dari Limbah Cair Surimi. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*. 5(1): 56–65.
- Supriyatna, A., Amalia, D., Jauhari, A. A., & Holydaziah, D. (2015). Aktivitas Enzim Amilase, Lipase, dan Protease dari Larva *Hermetia illucens* yang Diberi Pakan Jerami Padi. *Jurnal Kajian Islam, Sains, Dan Teknologi UIN Sunan Gunung Djati Bandung*. 9(2): 18–32.
- Tangtua, J., Techapun, C., Pratanaphon, R., Kuntiya, A., Sanguanchaipaiwong, V., Chaiyaso, T., Hanmoungjai, P., Seesuriyachan, P., Leksawasdi, N., & Leksawasdi, N. (2017). Partial Purification and Comparison of Precipitation Techniques of Pyruvate Decarboxylase Enzyme. *Chiang Mai Journal of Science*. 44(1): 184–192.
- Wilkesman, J., & Kurz, L. (2017). Zymography Principles. In J. Wilkesman & L. Kurz (Eds.), *Zymography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1626, pp. 3–10). Hatfield: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_1
- Yan, F., Ye, X., Li, C., Wang, P., Chen, S., & Lin, H. (2021). Isolation, Purification, Gene Cloning and Expression of Antifungal Protein from *Bacillus amyloliquefaciens* MG-3. *Food Chemistry*. 349(1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129130>
- Yilmaz, B., Baltaci, M. O., Sisecioglu, M., & Adiguzel, A. (2016). Thermotolerant Alkaline Protease Enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: Purification, Characterization, Effects of Surfactants and Organic Solvents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 31(6): 1241–1247. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1118687>
- Yohandini, H., Muharni, & Nainggolan, E. L. (2015). Growth Optimization of Thermophilic Bacteria *Bacillus thermoamylovorans* and *Brevibacillus* sp.

in Producing Keratinolytic Enzyme. *Proceeding of 5th International Seminar on New Paradigm and Innovation on Natural Sciences and Its Application (5th ISNPINSA)*. 1(1): 47–50.

- Yuanita S. P., D. N., & Wikandari, P. R. (2014). Screening Bakteri Proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Singgahan Tuban. *UNESA Journal of Chemistry*. 3(3): 49–54.
- Yuniati, R., Nugroho, T. T., & Puspita, F. (2015). Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *JOM FMIPA*. 1(2): 1–17.
- Yusra, & Efendi, Y. (2019). Kemampuan *Bacillus subtilis* VITNJ1 dari Saluran Pencernaan Ikan Nila dalam Memproduksi Enzim Protease. *Jurnal Riset Akuakultur*. 14(2): 30.
- Zafrida, S., Ethica, S. N., Ernanto, A. R., & Wijanarka, W. (2022). Optimization of Crude Protease Production from *Bacillus thuringiensis* HSFI-12 and Thrombolytic Activity Its Enzyme Dialysate. *Trends in Sciences*. 19(23); 1–11. <https://doi.org/10.48048/tis.2022.1952>
- Ziminska, M., Wilson, J. J., McErlean, E., Dunne, N., & McCarthy, H. O. (2020). Synthesis and Evaluation of a Thermoresponsive Degradable Chitosan-Grafted PNIPAAm Hydrogel as a “Smart” Gene Delivery System. *Materials*. 13(11): 1–21. <https://doi.org/10.3390/ma13112530>