

**ISOLASI ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI
DALAM LIMBAH TEMPE**

**Skripsi
Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana Kimia**



Retno Farida Rahajeng
18106030042
STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA
2023**



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Marsda Adisucipto Telp. (0274) 540971 Fax. (0274) 519739 Yogyakarta 55281

PENGESAHAN TUGAS AKHIR

Nomor : B-2256/Un.02/DST/PP.00.9/08/2023

Tugas Akhir dengan judul : Isolasi Enzim Protease dari Bakteri dalam Limbah Tempe

yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Nama : RETNO FARIDA RAHAJENG
Nomor Induk Mahasiswa : 18106030042
Telah diujikan pada : Senin, 14 Agustus 2023
Nilai ujian Tugas Akhir : A

dinyatakan telah diterima oleh Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

TIM UJIAN TUGAS AKHIR



Ketua Sidang
Dr. Esti Wahyu Widowati, M.Si
SIGNED

Valid ID: 64e5e21175605



Penguji I
Lela Susilawati, S.Pd., M.Si., PhD.
SIGNED

Valid ID: 64e580fb6b60



Penguji II
Ika Qurrotul Afifah, M.Si.
SIGNED

Valid ID: 64e42e5e7a3eb



Yogyakarta, 14 Agustus 2023
UIN Sunan Kalijaga
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
Prof. Dr. Dra. Hj. Khurul Wardati, M.Si.
SIGNED

Valid ID: 64e5c7a573574

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Retno Farida Rahajeng
NIM : 18106030042
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Isolasi Enzim Protease dari Bakteri dalam Limbah Tempe”** merupakan hasil penelitian saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kersajanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 01 Agustus 2023



Retno Farida Rahajeng
NIM. 18106030042

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA



SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Hal : Persetujuan Skripsi / Tugas Akhir

Lamp : -

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Retno Farida Rahajeng
NIM : 18106030042
Judul Skripsi : Isolasi Enzim Protease dari Bakteri dalam Limbah Tempe


sudah dapat diajukan kembali kepada Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam Program Studi Kimia.

Dengan ini kami mengharap agar skripsi/tugas akhir Saudara tersebut di atas dapat segera dimunaqasyahkan. Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Yogyakarta, 04 Agustus 2023

Pembimbing


Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si.,
M.Biotech.

NIP: 19760830 200312 2 001

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA



NOTA DINAS KONSULTASI

Hal : Persetujuan Skripsi/Tugas Akhir
Lamp : -

Kepada
Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta
di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Retno Farida Rahajeng
NIM : 18106030042
Judul Skripsi. : Isolasi Enzim Protease dari Bakteri dalam Limbah Tempe

sudah benar dan sesuai ketentuan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang Kimia.

Demikian kami sampaikan. Atas perhatiannya, kami ucapkan terimakasih.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Yogyakarta, 21 Agustus 2023
Konsultan

Lela Susilawati, S.Pd., M.Si., PhD.
NIP. 19790127 200901 2 004

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA



NOTA DINAS KONSULTASI

Hal : Persetujuan Skripsi/Tugas Akhir
Lamp : -

Kepada
Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta
di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Retno Farida Rahajeng
NIM : 18106030042
Judul Skripsi. : Isolasi Enzim Protease dari Bakteri dalam Limbah Tempe

sudah benar dan sesuai ketentuan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang Kimia.

Demikian kami sampaikan. Atas perhatiannya, kami ucapkan terimakasih.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Yogyakarta, 21 Agustus 2023
Konsultan

Ika Qurrotul Afifah, M.Si.
NIP. 19911128 201903 2 022

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA

MOTTO

“Put Allah first and everything will be fine”



STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya ini Saya persembahkan kepada:

Bapak, Ibu, dan Adik

Almamater Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.



KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Allah swt. yang telah melimpahkan rahmad dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “*Isolasi Enzim Protease dari Bakteri dalam Limbah Tempe*” dengan baik sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai derajat Sarjana Kimia. Tidak lupa *shalawat* serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad saw.

Kesulitan dan hambatan banyak penulis temui selama penyusunan skripsi ini. Namun, berkat pertolongan dari Allah swt., bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak penulis dapat melewati hambatan tersebut. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dan mendukung selama proses penyusunan skripsi hingga selesai. Penulis mengucapkan terima kasih dengan tulus kepada:

1. Prof. Dr. Phil. Al Makin, S.Ag., M.A. selaku Rektor UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
2. Dr. Dra. Hj. Khurul Wardati, M.Si. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
3. Dr. Imelda Fajriati, M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
4. Bapak Sudarlin, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan motivasi dan pengarahan selama studi.
5. Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si., M.Biotech. selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah ikhlas dan sabar meluangkan waktunya untuk membimbing, mengarahkan, mengoreksi, dan memberikan motivasi selama proses penyusunan skripsi.
6. Bapak dan Ibu Dosen Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta yang telah memberi ilmu selama studi.
7. Dr. Isma Kurniatanty, M.Si. selaku Kepala Laboatorium Bidang Biologi yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Biologi.
8. Ibu Ethik Susiawati Purnomo, S.Si. selaku Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) Pendamping selama melakukan penelitian di Laboratorium Biologi.
9. Seluruh staf dan karyawan Laboratorium Biologi khususnya Bapak Dony Eko Saputro, S.Pd.I. dan Ibu Anif Yuni Muallifah, S.Pd.I. yang telah membantu selama melakukan penelitian.
10. Kedua orang tua Bapak Drs. Saryadi dan Ibu Sugiyanti serta adik penulis Nindia Sila Rahajeng yang telah mendoakan dan memberi dukungan baik material maupun moral sehingga penulis dapat menyelesaikan studi derajat Strata Satu (S-1).
11. Teman-teman Program Studi Kimia angkatan 2018 (*Caffeine*) UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta yang telah menjadi teman selama perkuliahan dan memberi dukungan dan motivasi dalam penyusunan skripsi.
12. Teman-teman seperjuangan dosen pembimbing, Aisyiyah Audrey Maharani, Azkiyatul Masruroh, dan Ika Amalia yang telah membantu dan memberikan dukungan selama penelitian dan proses penyusunan skripsi.

13. Dinda Latifah Rahmawati dan Annisya Sayyida Hafshah yang telah membantu dalam penyusunan skripsi.
14. Diza Haris Pratiwi, Ilmiyatun Ainul Qolbi, Maulidana Nazilaturrahmaniyyah, dan Nita Suzana yang telah menjadi teman selama perkuliahan dan memotivasi dalam penyusunan skripsi.
15. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu atas segala bantuan dan dukungan selama proses penyusunan skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini masih banyak kekurangan sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis juga berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan secara umum dan kimia secara khusus.

Yogyakarta, 10 Mei 2023

Retno Farida Rahajeng
NIM. 18106030042



STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iii
SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI.....	iv
NOTA DINAS KONSULTASI.....	x
MOTTO.....	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
ABSTRAK.....	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Batasan Masalah.....	3
C. Rumusan Masalah.....	4
D. Tujuan Penelitian.....	4
E. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI.....	5
A. Tinjauan Pustaka.....	5
B. Landasan Teori.....	7
1. Limbah Tempe.....	7
2. Bakteri Proteolitik.....	8
3. Enzim Protease.....	8
4. Aktivitas Enzim Protease.....	10
5. Protease sebagai Biodetergen.....	11
C. Hipotesis.....	12
BAB III METODE PENELITIAN.....	15
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
B. Alat-Alat Penelitian.....	15
C. Bahan-Bahan Penelitian.....	15
D. Cara Kerja Penelitian.....	16
1. Pengambilan Sampel.....	16
2. Pembuatan Media.....	16
3. Isolasi Bakteri dan Pemurnian Isolat.....	17
4. Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik.....	18
5. Uji Aktivitas Proteolitik secara Kualitatif.....	20
6. Produksi Enzim Protease.....	20
7. Uji Aktivitas Enzim Protease.....	20
8. Penentuan Suhu Optimum.....	22
9. Penentuan pH Optimum.....	22
10. Stabilitas Aktivitas Enzim Protease.....	23

11. <i>Washing Test</i>	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
A. Isolasi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tempe	24
B. Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik	25
1. Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Proteolitik	25
2. Uji Biokimia Isolat Bakteri Proteolitik.....	29
C. Uji Aktivitas Proteolitik secara Kualitatif.....	31
D. Uji Aktivitas Enzim Protease	33
E. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	35
F. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Protease	37
G. Uji Stabilitas Aktivitas Enzim Protease terhadap Detergen.....	39
H. <i>Washing Test</i>	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
A. Kesimpulan	44
B. Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	54
CURRICULUM VITAE.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1. Hasil uji morfologi isolat bakteri proteolitik meliputi bentuk, elevasi, margin, warna, bentuk sel, pewarnaan garm, dan pewarnaan endospora....	25
Tabel 4. 2. Hasil uji biokimia isolat bakteri proteolitik yang meliputi uji hidrolisis pati, uji VP, dan uji NaCl 6,5%. Tanda (+) menunjukkan hasil positif dan tanda (-) menunjukkan hasil negatif.	29
Tabel 4. 3. Tabel tahap-tahap hidrolisis amilum (pati) dan warna yang terbentuk setelah penambahan lugol (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).....	30
Tabel 4. 4. Hasil uji aktivitas proteolitik isolat P12d, P16d, P22a, dan R3d berdasarkan perhitungan indeks proteolitik.....	32
Tabel 4. 5. Hasil stabilitas aktivitas ekstrak kasar enzim protease isolat P12d, P16d, P22a, dan R3d terhadap paparan detergen komersial.....	39
Tabel 4. 6. Hasil uji potensi ekstrak kasar enzim protease isolat P12d, P16d, P22a, dan R3d sebagai komponen aditif biodetergen yang meliputi aktif pada suhu 30 – 50°C, aktif pada pH basa, stabilitas aktivitas protease dengan paparan detergen lebih dari 70%, serta washing test. Tanda (+) berarti memenuhi syarat dan tanda (-) berarti tidak memenuhi syarat.	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Reaksi hidrolisis dipeptida menjadi asam-asam amino oleh enzim protease (Saltvedt, 2015).	9
Gambar 4. 1. Hasil isolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe. (A) Isolat kode P12d, (B) Isolat kode P16d, (C) Isolat kode P22a, dan (D) Isolat kode R3d pada media SMA menunjukkan zona bening di sekitar koloni.	25
Gambar 4. 2. Hasil uji pewarnaan gram isolat bakteri proteolitik dilihat pada perbesaran 40×10 menggunakan mikroskop. (A) Isolat kode P12d, (B) Isolat kode P16d, (C) Isolat kode P22a, dan (D) Isolat kode R3d menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri merupakan bakteri gram positif yang ditandai dengan warna ungu pada sel bakteri dan berbentuk basil.	27
Gambar 4. 3. Hasil uji pewarnaan endospora isolat bakteri proteolitik dilihat pada perbesaran 40×10 menggunakan mikroskop. (A) Isolat kode P12d, (B) Isolat kode P16d, (C) Isolat kode P22a, dan (D) Isolat kode R3d menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri mampu menghasilkan endospora yang ditandai dengan warna hijau pada endospora.	28
Gambar 4. 4. Reaksi hidrolisis pati menjadi maltosa oleh enzim amilase kemudian maltosa dipecah lagi menjadi glukosa oleh enzim maltase (Cappuccino and Sherman, 2014).	30
Gambar 4. 5. Reaksi fermentasi glukosa menghasilkan 2,3-butandiol asetilmetilkarbinol dari asam organik.	31
Gambar 4. 6. Reaksi asetilmetilkarbinol dengan reagen <i>Barritt's A</i> dan <i>B</i> menjadi senyawa kompleks berwarna merah muda/merah (Cappuccino and Sherman, 2014).	31
Gambar 4. 7. Hasil uji aktivitas proteolitik dengan (A) Isolat kode P12d, (B) Isolat kode P16d, (C) Isolat kode P22a, dan (D) Isolat kode R3d. Nilai IP masing-masing isolat secara berurutan adalah 2,48; 3,07; 3,48; dan 3,53.	33
Gambar 4. 8. Hasil uji aktivitas ekstrak kasar enzim protease isolat P12d, P16d, P22a, dan R3d pada suhu 37°C serta pH 7.	34
Gambar 4. 9. Hasil uji aktivitas ekstrak kasar enzim protease isolat P12d, P16d, P22a, dan R3d dengan variasi suhu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, dan 50°C pada pH 7.	36
Gambar 4. 10. Hasil uji aktivitas ekstrak kasar enzim protease isolat P12d, P16d, P22a, dan R3d dengan variasi pH 6, 7, 8, 9, dan 10 pada suhu optimum masing-masing isolat.	38
Gambar 4. 11. Aktivator dapat mengaktifkan enzim yang tidak aktif menjadi aktif atau dapat juga meningkatkan kerja enzim pada enzim yang sudah aktif.	40

Gambar 4. 12. Hasil washing test menggunakan noda kecap pada kain katun. (A) Isolat P12d, (B) Isolat P16d, (C) Isolat P22a, dan (D) Isolat R3d. (1) kain bernoda dicuci dengan akuades, (2) kain bernoda dicuci dengan larutan detergen, (3) kain bernoda dicuci dengan ekstrak kasar enzim, dan (4) kain bernoda dicuci dengan larutan detergen dan ekstrak kasar enzim. Semua variasi dicuci pada suhu 50°C selama 15 menit dalam shaker incubator dengan kecepatan 120 rpm..... 41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil uji biokimia isolat bakteri proteolitik meliputi uji hidrolisis pati, uji VP, dan uji NaCl 6,5%	54
---	----



ABSTRAK

ISOLASI ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI DALAM LIMBAH TEMPE

Oleh:

Retno Farida Rahajeng
18106030042

Dosen Pembimbing:

Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si., M.Biotech.

Limbah cair tempe mengandung bahan organik berupa protein, karbohidrat, dan lemak. Kandungan protein yang tinggi dapat menjadi nutrisi bagi pertumbuhan bakteri proteolitik (penghasil protease). Isolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim protease. Protease mampu menghidrolisis protein serta dapat digunakan sebagai komponen biodetergen. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe kemudian enzim protease diuji aktivitas dan potensinya sebagai komponen aditif biodetergen dengan uji stabilitas aktivitas protease dan *washing test*.

Isolasi bakteri proteolitik dilakukan dengan media selektif *Skim Milk Agar* (SMA) dengan kasein sebagai substrat. Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan variasi suhu (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, dan 50°C) serta pH (6, 7, 8, 9, dan 10). Potensi protease sebagai salah satu komponen aditif biodetergen diuji dengan stabilitas protease terhadap detergen komersial dan *washing test* menggunakan noda kecap pada kain katun.

Hasil penelitian ini didapatkan empat isolat bakteri proteolitik dengan kode P12d, P16d, P22a, dan R3d. Aktivitas protease optimum isolat P12d pada suhu 50°C dan pH 9, isolat P16d pada suhu 45°C dan pH 9, isolat P22a pada suhu 50°C dan pH 7, serta isolat R3d pada suhu 50°C pada pH 8. Uji stabilitas protease terhadap detergen komersial dari keempat isolat berada di atas 70% dan dapat menghilangkan noda kecap pada kain katun. Berdasarkan hasil yang diperoleh, keempat isolat bakteri proteolitik dari limbah cair tempe berpotensi komponen aditif biodetergen.

Kata kunci: proteolitik, limbah cair tempe, protease, biodetergen.

ABSTRACT

ISOLATION OF PROTEASE ENZYMES FROM BACTERIA IN TEMPE WASTE

By:

Retno Farida Rahajeng
18106030042

Advisor:

Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si., M.Biotech.

Tempe liquid waste contains organic matter in the form of proteins, carbohydrates, and fats. The high protein content can be a nutrient for the growth of proteolytic bacteria (protease producers). Isolation of proteolytic bacteria from tempe liquid waste was carried out to obtain crude extracts of the protease enzymes. Proteases are able to hydrolyze proteins and can be used as biodetergent additive component. The purpose of this research was to isolate proteolytic bacteria from tempe liquid waste and then test its protease enzymes activity and potential as biodetergent additive component by testing the stability of protease activity and washing test.

Isolation of proteolytic bacteria was carried out using selective Skim Milk Agar (SMA) media with casein as a substrate. Protease activity testing was carried out with variations in temperature (30°C, 35°C, 40°C, 45°C and 50°C) and pH (6, 7, 8, 9 and 10). The potency of protease as one of biodetergent additive components was tested by the stability of the protease against commercial detergents and a washing test using soy sauce stains on cotton fabrics.

The results of this research obtained four proteolytic bacterial isolates with the codes P12d, P16d, P22a, and R3d. Optimum protease activity isolate P12d at 50°C and pH 9, isolate P16d at 45°C and pH 9, isolate P22a at 50°C and pH 7, and isolate R3d at 50°C at pH 8. Stability test protease to commercial detergents from the four isolates was above 70% and could remove soy sauce stains on cotton fabrics. Based on the results obtained, the four isolates of proteolytic bacteria from tempe liquid waste have the potential as biodetergent additive component.

Keywords: *proteolytic, tempe liquid waste, protease, biodetergent.*

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tempe merupakan makanan olahan berbahan baku kacang kedelai hasil fermentasi menggunakan bantuan jamur *Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* (Ellent *et al.*, 2022). Industri pembuatan tempe telah tersebar hampir di setiap kota di Indonesia. Sebagian besar industri tempe dikerjakan secara tradisional dalam skala rumah tangga. Pada umumnya limbah cair tempe dibuang tanpa Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL). Pembuangan limbah cair tempe ke saluran-saluran pembuangan, selokan, atau badan air secara langsung dapat mengakibatkan pencemaran lingkungan, terutama di sekitar tempat industri (Harahap, 2013).

Menurut Arifin (2016) Limbah cair tempe mengandung bahan organik berupa protein, karbohidrat, dan lemak, yang dapat digunakan sebagai sumber nutrisi bagi mikroorganisme. Kandungan protein yang tinggi dapat mendukung kemampuan mikroorganisme dalam menghasilkan bakteri pennghasil enzim protease. Winahyu *et al.* (2019) telah berhasil melakukan isolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe di Kota Semarang. Hasilnya diperoleh 3 isolat bakteri proteolitik. Beberapa bakteri proteolitik dari limbah cair tahu adalah *Staphylococcus* (Fatoni *et al.*, 2008), *Bacillus subtilis*, serta *Bacillus cereus* (Supriyanti *et al.*, 2013).

Protease dapat dihasilkan dari tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease terbatas oleh tersedianya lahan tanam dan kondisi pertumbuhan yang sesuai, serta memerlukan waktu produksi enzim yang lama. Produksi protease dari hewan juga dibatasi oleh ketersediaan

ternak penghasil enzim. Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling potensial dibandingkan tanaman dan hewan. Penggunaan mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, dan lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan (Yuniati *et al.*, 2015).

Protease dapat berpotensi dalam berbagai industri, seperti industri makanan, kulit, kimia, medis, pengolahan limbah, dan detergen (Razzaq *et al.*, 2019). Detergen merupakan bahan pembersih yang umum digunakan oleh masyarakat, baik oleh rumah tangga maupun industri. Detergen membantu kegiatan pencucian tetapi menimbulkan efek pencemaran terhadap lingkungan (Radiansyah, 2011). Biodetergen merupakan detergen ramah lingkungan tanpa bahan kimia tambahan. Enzim protease berfungsi untuk menghidrolisis noda protein pada pakaian sehingga kotoran yang mengandung protein seperti darah, lendir, dan keringat akan mudah tercuci. Protease digunakan pada deterjen karena bersifat biodegradasi dan dapat meningkatkan kerja deterjen secara umum (Amara *et al.*, 2009). Protease yang terdapat pada deterjen biasanya bekerja pada pH alkali dan suhu yang cukup tinggi (Hmidet *et al.*, 2009).

Menurut Banik *and* Prakash (2004) isolat bakteri protease *Bacillus cereus* memiliki aktivitas protease optimum pada suhu 50°C dan pH 10,5. Protease dari *Bacillus cereus* 80% stabil dengan detergen komersial pada inkubasi 50°C selama 1 jam. Berdasarkan Kumar *and* Bhalla (2013) bakteri *Bacillus sp.* dengan aktivitas protease optimum pada suhu 60 – 75°C dan pH 9, aktif sebesar 78% dengan detergen komersial pada suhu 30°C selama 24 jam, serta mampu menghilangkan

noda darah dan kuning telur di kain katun pada suhu 65°C dan pH 9. Oleh karena itu, enzim protease dari bakteri *Bacillus sp.* dan *Bacillus cereus* berpotensi sebagai komponen aditif biodetergen.

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe. Enzim protease dari isolat bakteri yang didapatkan akan diuji potensinya sebagai komponen aditif biodetergen.

B. Batasan Masalah

Supaya penelitian ini tidak meluas pembahasannya, maka diambil batasan masalah sebagai berikut:

1. Bakteri proteolitik diisolasi dari sampel limbah cair tempe berupa limbah cair perebusan kedelai pertama dan kedua yang diperoleh dari daerah Ngestiharjo, Kasian, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY).
2. Karakterisasi isolat bakteri proteolitik yang dilakukan meliputi uji morfologi dan uji biokimia.
3. Uji aktivitas isolat bakteri proteolitik dilakukan secara kualitatif dengan pengukuran Indeks Proteolitik (IP).
4. Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
5. Uji potensi enzim protease sebagai komponen aditif biodetergen dilakukan dengan uji stabilitas aktivitas protease dan *washing test*.

C. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana isolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe?
2. Bagaimana aktivitas enzim protease dari isolat bakteri proteolitik limbah cair tempe pada variasi suhu dan pH?
3. Bagaimana potensi enzim protease dari isolat bakteri proteolitik limbah cair tempe sebagai komponen aditif biodetergen?

D. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengisolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe.
2. Menguji aktivitas enzim protease dari isolat bakteri proteolitik limbah cair tempe pada variasi suhu dan pH.
3. Menguji potensi enzim protease dari isolat bakteri proteolitik limbah cair tempe sebagai komponen aditif biodetergen.

E. Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai proses isolasi bakteri proteolitik dari limbah cair tempe serta potensi enzim protease sebagai komponen aditif biodetergen.
2. Memberikan informasi kepada peneliti lain yang akan mengembangkan penelitian dengan topik sejenis.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Isolasi bakteri proteolitik dapat dilakukan dengan media *Skim Milk Agar* (SMA). Bakteri proteolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada media SMA. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan empat isolat bakteri proteolitik, yaitu P12d, P16d, P22a, dan R3d.
2. Protease dari keempat isolat menunjukkan aktivitas pada rentang suhu 30 – 50°C serta pH 6 – 10. Isolat P16d memiliki suhu optimum pada 45°C. Selanjutnya isolat P12d, P22a, dan R3d mempunyai suhu optimum 50°C. Pada variasi pH, isolat P22a optimum pada pH 7. Isolat R3d optimum pada pH 8. Selanjutnya isolat P12d dan P16d memiliki pH optimum pada pH 9.
3. Protease yang berpotensi sebagai komponen aditif detergen adalah isolat P12d, P16d, P22a, dan R3d.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada karakterisasi bakteri supaya dapat dipastikan spesies dari bakteri yang diisolasi.
2. Perlu dilakukan pemurnian enzim supaya didapatkan aktivitas protease yang lebih spesifik.
3. Perlu dilakukan variasi detergen komersial yang digunakan pada stabilitas aktivitas protease supaya diketahui aktivitas protease yang bervariasi dan dapat dipilih yang terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., Ellaiah, P. & Prasad, D.S. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease From a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *Pharm. Sci. Tech.*, 4(4): 1–9.
- Amara, A.A., Salem, S.R. & Shabeb, M.S.A. 2009. The Possibility to Use Bacterial Protease and Lipase as Biodetergent. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2): 104–114.
- Anbari, I., Fitriadi, R., Nurhafid, M., Palupi, M. & Riviani 2022. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik dari Perairan Sistem Budidaya Mina Padi. *Jurnal Ilmu Perikanan dan Kelautan*, 4(2): 46–56.
- Andika, Z.P. & Suilstyarsi, A. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik pada Limbah Air Cucian Ayam Potong dan Cucian Ikan sebagai Penyusun Modul Biologi SMA Kelas X. *Prosiding Seminar Nasional SIMBIOSIS II*, 357–367.
- Ansumar & Fibriarti, B.L. 2019. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktak (BAL) Kandidat Prebiotik dari Terasi Tradisional di Pekanbaru. 1–14.
- Arifiani, N. & Ethica, S.N. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Lipase dan Protease yang Berpotensi sebagai Agen Bioremediasi dari Limbah Biomedis Cair Puskesmas Halmahera Kota Semarang. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*, 1: 268–275.
- Arifin, W. 2016. *Rancang Bangun Alat Konversi Biogas Limbah Cair Tempe dan Pengujian dengan Penambahan Variasi Campuran Sekam Padi*. Skripsi. Fakultas Teknik. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Asril, M. & Leksikowati, S.S. 2019. Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik asal Limbah Cair Tahu sebagai Dasar Penentuan Agen Pembuatan Biofertilizer. *Elkawnie: Journal of Islamic Science and Technology*, 5(2): 86–99.
- Baehaki, A. & Rinto 2012. Karakterisasi Protease dari Isolat Bakteri asal Tumbuhan Rawa dari Indralaya. *JPHPI*, 15(1): 59–65.
- Banik, R.M. & Prakash, M.. 2004. Laundry Detergent Compatibility ff The Alkaline Protease from *Bacillus Cereus*. *Microbiological Research*, 159(2): 135–140.

- Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P.K., Nain, L. & Shukla, P. 2016. An Alkaline Protease from *Bacillus pumilus* MP 27: Functional Analysis of Its Binding Model Toward Its Applications as Detergent Additive. *Front Microbiol*, 7(1195).
- Bornscheuer, U., Huisman, G., Kazlauskas, R., Lutz, S., Moore, J. & Robins, K. 2012. Engineering The Third Wave of Biocatalysis. *Nature*, 485: 185–194.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. 2014. *Microbiology: a Laboratory Manual 10th edition*. New York: Pearson Education, Inc.
- Chu, W.H. 2006. Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production from Species of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(3): 241–245.
- Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiment*, 19(19): 899.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G. & Wen, T. 2010. Bioresource Technology Purification and Characterization of a Surfactant-Stable High-Alkaline Protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101(18): 7100–7106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.130>.
- Durham, D.R., Stewart, D.B. & Stellwag, E.J. 1987. Novel alkaline and heat stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *Journal of Bacteriology*, 169(6): 2762–2768.
- Ellent, S.S.C., Dewi, L. & Tapilouw, M.C. 2022. Karakteristik Mutu Tempe Kedelai (*Glycine max* L.) yang Dikemas dengan Klobot. *AGRITEKNO: Jurnal Teknologi Pertanian*, 11(1): 32–40.
- Emran, M.A., Ismail, S.A. & Hashem, A.M. 2020. Production of Detergent Stable Thermophilic Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26(2): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101631>.
- Enggel, J., Meriandini, A. & Natalia, L. 2004. Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 9(1): 9–12.
- Fatoni, A., Zusfahair & Lestari, P. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu. *Jurnal Natur Indonesia*, 10(2): 83–88.

- Ferdiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Fitriana, N. & Asri, M.T. 2022. Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max L.*) di Trenggalek. *LenteraBio*, 11(1): 144–152.
- Fitriasari, P.D., Amalia, N. & Farkhiyah, S. 2020. Isolasi dan Uji Kompatibilitas Bakteri Hidrolitik dari Tanah Tempat Pemrosesan Akhir Talangagung, Kabupaten Malang. *Berita Biologi*, 19(2): 151–156.
- Fong, K.P.Y. & Tan, H.M. 2000. Isolation of a Microbial Consortium from Activated Sludge for The Biological Treatment of Food Waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5): 441–443.
- Hadj-Ali, N.E., Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S. & Nasri, M. 2006. Biochemical and Molecular Characterization of A Detergent Stable Alkaline Serine-Protease from A Newly Isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4): 515–523.
- Hames, D. & Hooper, N. 2000. *Instant Notes in Biochemistry*. Second Edition. London: Taylor & Francis.
- Harahap, S. 2013. Pencemaran Perairan Akibat Kadar Amoniak yang Tinggi dari Limbah Cair Industri Tempe. *Jurnal Akuatika*, 4(2): 183–194.
- Hemraj, V., Diksha, S. & Avneet, G. 2013. A Review on Commonly Used Biochemical Test for Bacteria. *Innovare Journal Life Science*, 1(1): 1–7.
- Herasari, D., Salsabilla, A.R., Parwathi, I., Laila, A., Mulyono & Suharso 2022. Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Klebsiella* sp. Indigen Tanah Tercemar Minyak di Bandar Lampung. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 7(1): 35–53.
- Hmidet, N., Ali, N.E., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. & Nasri, M. 2009. Alkaline Proteases and Thermostable Alpha-Amylase Co-Produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and Potential Application as Detergent Additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47: 71–79.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- Imtiyaz, A.N. & Octavia, B. 2023. Identifikasi Bakteri pada Bintil Akar Aktif dan Tidak Aktif serta Rhizosfer Kacang Tanah. *Jurnal Kingdom The Journal of Biological Studies*, 9(1): 63–74.
- Jaziri, A.A., Sukoso & Firdaus, M. 2017. Karakteristik Protease dari Ekstrak Kasar Khamir Laut dan Aktivitasnya dalam Menghidrolisis Protein Ikan Rucah. *Journal of Fisheries and Marine Science*, 1(2): 78–87.
- Kabense, R., Ginting, E.L., Wullur, S., Kawung, N.J., Losung, F. & Tombokan, J.L. 2019. Penapisan Bakteri Proteolitik yang Bersimbiosis dengan Alga *Gracillaria* sp. 7(2): 413–418.
- Kuddus, M. & Ramteke, P.W. 2010. Production Optimization of an Extracellular Cold-Active Alkaline Protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and Its Application in Detergent Industry. *African Journal of Microbiology Research*, 5(7): 809–816.
- Kumar, D. & Bhalla, T.C. 2013. *Bacillus* sp. APR-4 Protease as a Laundry Additive. *Indian Journal of Biotechnology*, 3: 563–567.
- Kurniatanty, I. & Widowati, E.W. 2021. Enzymatic Activity of Protease Producing Bacteria from Tofu Waste. *Proceedings of KOBI 2nd International Conference on Management of Tropical Biodiversity for Human Welfare: From Ecosystem to Molecular*, 1: 67–71.
- Lam, M.Q., Mut, N.H.N., Thevarajoo, S., Chen, S.J., Selvaratnam, C., Hussin, H., Jamaluddin, H. & Chong, C.S. 2018. Characterization of Detergent Compatible Protease from Halophilic *Virgibacillus* sp. CD6. *3 Biotech*, 8(2): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1133-2>.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Lestari, P.B. 2014. Biodegradasi Limbah Cair Tahu dari Mikroorganisme Indigen sebagai Bahan Ajar Mikrobiologi Lingkungan di Perguruan Tinggi. *Jurnal Edukasi Matematika dan Sains*, 2(1): 84–94.
- Linda, T.M., Devi, S. & Roza, R.M. 2015. Aktivitas Protease Alkalin oleh Bakteri Termofilik Alkalitoleran dari Sumber Air Panas Desa Sungai Pinang Kabupaten Kuantan Singingi, Riau. *Prosiding Semirata Universitas Tanjungpura Pontianak*, 351–358.

- Maranggi, I.U., Rahmasari, B., Kania, F.D., Fadarina, Purnamasari, I. & Maidinariasty, A. 2020. Aplikasi Biosurfaktan dari Daun Sengon (*Albizia Falcataria*) dan Lingkungan. *Politeknik Negeri Sriwijaya, Prosiding Seminar Mahasiswa Teknik Kimia*, 1(1): 11–19.
- Marnolia, A., Haryani, Y. & Puspita, F. 2016. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Endofit Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis quinensis*). *Jurnal Photon*, 6(2): 1–5.
- Muchtadi, D., Plupi, N.S. & Nukui, E. 1996. *Enzim dalam Industri Pangan*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi IPB.
- Mukamto, Ulfah, S., Mahalina, W., Syauqi, A., Istiqfaroh, L. & Trimulyono, G. 2015. Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus* sp. Pelarut Fosfat dari Rhizosfer Tanaman Leguminosae. *Sains & Matematika*, 3(2): 62–68.
- Naiola, E. & Widhyastuti, N. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp. *Berk. Penel. Hayati*, 13: 51–56.
- Nascimento, W.C.A. & Martins, M.L.L. 2006. Studies on The Stability of Protease from *Bacillus* sp. and Its Compatibility with Commercial Detergent. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 307–311.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third Edit ed. New York: Worth Publishers.
- Niyonzima, F.N. & More, S.S. 2015. Minireview Coproduction of Detergent Compatible Bacterial Enzymes and Stain Removal Evaluation. *Journal of Basic Microbiology*, 55: 1149–1158.
- Noviyanti, T., Ardiningsih, P. & Rahmalia, W. 2012. Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *JKK*, 1(1): 31–34.
- Nurmalinda, A., Periadnadi & Nurmiati 2013. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Bakteri Indigenous Pemfermentasi dari Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 2(1): 8–13.
- Palsaniya, P., Mishra, R., Beejawat, N., Sethi, S. & Gupta, B.L. 2012. Optimization of Alkaline Protease Production from Bacteria Isolated from Soil. *Journal Microbiology Biotechnology Research*, 2(6): 858–865.

- Pathak, A.P. & Rathod, M.G. 2018. A Review on Alkaline Protease Producers and Their Biotechnological Perspectives. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 47(6): 1113–1119.
- Phanse, N., Desai, P. & Patel, B. 2010. Applicability of Alkaline Protease and Alkaline Amylase of *Bacillus agaradhaerens* MTCC 9416. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 3(1): 107–108.
- Poedjiadi, A. & Supriyanti, F.M.S. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Puspitasari, F.D., Shovitri, M. & Kuswytasari, N.D. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangki Septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1(1): 3–6.
- Radiansyah 2011. Dampak Kandungan Detergen dalam Tanah Terhadap Makhluk Hidup (Hewan dan Tumbuhan). *Jurnal Riset Daerah*, 7(3): 243–250.
- Ratnayani, K., Huwarni, A.A.A.S., Laksmiwati, A.A.I.A.M. & Dewi, I.G.A.K.S.P. 2015. Uji Aktivitas Protease Getah Labu Siam dan Talas serta Perbandingannya Terhadap Getah Pepaya. *Jurnal Kimia*, 9(2): 147–152.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. & Ashraf, M. 2019. Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7: 1–20.
- Rezakhani, N., Rad, A.M., Parivar, K., Khayati, M. & Etemadzade, S. 2014. Immobilization of Protease in Biopolymers (Mixture of Alginate-Chitosan). *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*, 5(4): 108–113.
- Rizkuloh, L.R., Adlina, S. & Yuliana, A. 2021. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Protease Ekstraseluler Dari Limbah Cair Tahu Putih. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada : Jurnal Ilmu Ilmu Keperawatan, Analisis Kesehatan dan Farmasi*, 21(2): 187–193.
- Rodrigues, P.M., Andrade, V.V. V. & Martins, M.L.L. 2013. Stability and Activity of the Partially Purified Spray-Dried Protease from *Bacillus* sp SMIA-2 and Its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *Int. J. Bioassays*, 2(3): 562–567.
- Rutu, I., Natsir, H. & Arfah, R. 2015. Production of Protease Enzyme from Bacteria in Hot Spring Of South Sulawesi, *Bacillus licheniformis* HSA3-1a. *Jurusan Kimia FMIPA UNHAS*, 16(1): 10–17.

- Said, M.I. & Likadja, J.C. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi Sebagai Penghasil Enzim Protease pada Industri Penyamakan Kulit PT. Adhi Satria Abadi (ASA), Yogyakarta. *JITP*, 2(2): 121–128.
- Said, N.I. & Wahjono, H.D. 1999. *Teknologi Pengolahan Air Limbah Tahu-Tempe dengan Proses Biofilter Anaerob dan Aerob*. Jakarta: Badan Pengkajian Dan Penerapan Teknologi.
- Saltvedt, E. 2015. *Protein Hydrolysates and Oil from Herring Rest Raw Material*. Thesis. Department of Biotechnology. Norwegian University of Science and Technology.
- Sari, D. & Rahmawati, A. 2020. Analisa Kandungan Limbah Cair Tempe Air Rebusan dan Air Rendaman Kedelai. *Jurnal Ilmiah Media Husada*, 9(1): 36–41.
- Sayow, F., Polii, B.V.J., Tilaar, W. & Augustine, K.D. 2020. Analisis Kandungan Limbah Industri Tahu dan Tempe Rahayu di Kelurahan Uner Kecamatan Kawangkoan Kabupaten Minahasa. *Agri-SosioEkonomi Unsrat*, 16(2): 245–252.
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N.E., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S. & Moncef, N. 2008. Stability of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in Commercial Solid Laundry Detergent Formulations. *Microbiological Research*, 163: 299–306.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. & Mehta, P.K. 2016. Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st Century. *3 Biotech*, 6(174): 1–15.
- Singleton, P. & Sainsbury, D. 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd Edition*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Sinha, R. & Khare, S.K. 2012. Isolation of a Halophilic *Virgibacillus* sp. EMB13: Characterization of Its Protease for Detergent Application. *Indian Journal of Biotechnology*, 11: 416–426.
- Smith, E.J. 1993. *Prinsip Bioteknologi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Soeka, Y.S. & Sulistiani 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus Subtilis* A1 InaCC B398 Yang Diisolasi dari Terasi Samarinda. *Berita Biologi*, 13(2): 203–212.

- Soeka, Y.S. & Sulistiani 2017. Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Stenotrophomonas* sp. asal Gunung Bromo, Jawa Timur. *Berita Biologi*, 16(2): 203–211.
- Sumardi, Farisi, S., Ekowati, C.N. & Diana, M.S. 2019. Aktivitas dan Karakterisasi Enzim Protease Isolat *Bacillus* sp. (UJ132) secara Kualitatif dan Kuantitatif. *Jurnal Riset Akuakultur*, 14(3): 193–199.
- Sumarlin, L.O. 2008. Aktivitas Protease dari *Bacillus circulans* pada Media Pertumbuhan dengan pH Tidak Terkontrol. *Jurnal Valensi*, 1(2): 58–62.
- Supriyanti, T.F.M., Kadarohman, R.A. & Munawaro, M. 2013. Liquid Waste of Tofu as an Alternatives Medium in *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* Protease Production. *Proceeding International Seminar on Mathematics, Science, and Computer Science Education*, 14–21.
- Susanti, E.V.H. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Jurnal Biodiversitas*, 4(1): 12–17.
- Tarek, H., Nam, K. Bin, Kim, Y.K., Suchi, S.A. & Yoo, J.C. 2023. Biochemical Characterization and Application of a Detergent Stable, Antimicrobial and Antibiofilm Potential Protease from *Bacillus siamensis*. *International Journal of Molecular Sciences Article*, 24(5574): 1–17.
- Utami, L.A. & Supriyadi, A. 2018. Pemanfaatan Limbah Tahu sebagai Media Pertumbuhan *Aspergillus flavus* DUCC-K225 untuk Produksi Enzim Protease. *Jurnal Berkala Bioteknologi*, 1(1).
- Utarti, E., Nurita, L. & Arimurti, S. 2009. Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus* sp. 31. *Jurnal ILMU DASAR*, 10(1): 102–108.
- Wahyuna, D., Agustien, A. & Periadnadi 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Thermo-Proteolitik Sumber Air Panas Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 1(2): 93–98.
- Wardani, A.K. & Nindita, L.O. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Hasil Isolasi dari Whey Tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(3): 149–156.
- Winahyu, P., Sulistyningtyas, A.R. & Darmawati, S. 2019. Isolasi Bakteri Indigenous Penghasil Enzim Protease dari Limbah Cair Industri Tempe. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus*, 2: 140–146.

Yuniati, R., Nugroho, T.T. & Puspita, F. 2015. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *JOM FMIPA*, 1(2): 116–122.

