

**LAPORAN AKHIR TAHUN
RISET DASAR UNGGULAN UNSRAT**



**IDENTIFIKASI MOLEKULER DAN KARAKTERISASI PROTEASE
DARI BAKTERI TERMOFILIK PERAIRAN HIDROTHERMAL
PANTAI MOINIT, SULAWESI UTARA**

Tahun ke- 1 dari rencana 2 tahun

Ir. Elvy Like Ginting, MSi, PhD (NIDN: 0011016802)
Dr. Veibe Warouw S.Pi, MSi (NIDN: 0027027105)
Kurniati Kemer, S.IK, MSi (NIDN: 0031108002)

Universitas Sam Ratulangi

November 2018

Dibiayai Oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan Kemenristekdikti
Sesuai dengan Kontrak Penelitian Tahun Anggaran 2018

HALAMAN PENGESAHAN
RISET DASAR UNGGULAN UNSRAT (RDUU)

Judul

IDENTIFIKASI MOLEKULER DAN KARAKTERISASI PROTEASE DARI BAKTERI TERMOFILIK PERAIRAN HIDROTHERMAL PANTAI MOINIT, SULAWESI UTARA

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : ELVY L. GINTING,
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi
NIP/NIK : 196801111991032001
NIDN : 0011016802
Jabatan / Golongan : Lektor Kepala - IV/b
Fakultas / Program Studi : Fakultas Perikanan dan ilmu kelautan - Ilmu kelautan
Nomor HP : 085241253745
Alamat surel(e-mail) : elvy_like@yahoo.com
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 Tahun
Biaya Yang Diusulkan : Rp. 39,000,000
Biaya Maksimum : Rp. 40,000,000

Anggota**Anggota (1)**

Nama : VEIBE WAROUW,
NIDN : 0027027105
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi

Anggota (2)

Nama : KURNIATI KEMER
NIDN : 0031108002
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi



Mengetahui
Dekan Fakultas Perikanan dan ilmu kelautan,

(Prof. Dr. Farris B. Boneka, M.Sc)
NIP/NIK : 195712291985031004

Manado, 21 November 2018
Ketua,


(IR. ELVY L. GINTING, M.SI., PHD)
NIP/NIK : 196801111991032001



Menyetujui,
Ketua LPPM UNSRAT

(Prof. Dr. Ir. Charles L. Kaunang, MS)
NIP/NIK : 195910181986031002

RINGKASAN

Bakteri termofilik merupakan sumber bagi enzim industri termostabil. Eksplorasi bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Salah satunya adalah bakteri proteolitik termofilik yang menghasilkan enzim protease yang stabil terhadap panas dan mampu mengkatalis reaksi kimia dengan cepat pada suhu tinggi. Sulawesi Utara memiliki beberapa perairan hidrotermal laut, salah satunya adalah perairan hidrotermal pantai Moinit.

Bakteri proteolitik termofilik telah berhasil diisolasi dari perairan hidrotermal pantai Moinit. Setiap isolat bakteri proteolitik memiliki karakteristik morfologi yang berbeda. Akan tetapi, isolat bakteri ini belum diidentifikasi secara sempurna dan enzim protease dari bakteri ini belum diteliti. Oleh sebab itu tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik secara sempurna lewat identifikasi molekuler serta mengekstraksi, purifikasi dan karakterisasi enzim protease yang dihasilkannya. Tujuan jangka panjang hasil penelitian ini sangat berguna dalam penggunaan dan pengembangan pemanfaatan bakteri termofilik maupun enzim protease tahan panas, lebih khusus dalam bidang teknologi industri. Pada tahun pertama ini, bakteri telah diidentifikasi secara molekuler lewat amplikasi gen 16S rRNA menggunakan PCR dengan primer universal untuk domain bakteri. Isolasi genomik telah berhasil dilakukan untuk isolate 2b, 4b, 9a dan 9b. Gen penyandi protease isolate 2b telah diamplifikasi dengan primer keratinase. Urutan DNA nukleotida dari produk hasil amplifikasi disekuens dan dibandingkan dengan sekuen data base *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Berdasarkan hasil BLAST analysis dari sekuen 16S rDNA menunjukkan bahwa isolate 2b memiliki kesamaan dengan *Bacillus cereus* (99% identity), 4b dan 9a memiliki kesamaan dengan *B. subtilis* (100% identity), dan 9b dengan *Pseudomonas balearica* (98% identity).

Selanjutnya, pada tahun kedua, protease akan diproduksi menggunakan media TMM dan dipurifikasi dengan fraksinasi ammonium sulfat dan dialisis. Aktivitas protease akan diuji dengan menggunakan metode Bergmeyer dan Ward (1984) yang dimodifikasi. Penentuan protein akan menggunakan metode Lowry 1964 dalam Bollag *et al*, 1996. Kemudian protease akan ditentukan waktu produksi optimum, suhu dan pH optimum serta pengaruh katalisator dan inhibitor.

Kata kunci : Bakteri termofilik, DNA, identifikasi molekuler. karakterisasi, protease.

PRAKATA

Universitas Sam Ratulangi merupakan lembaga pendidikan tinggi yang sangat memotivasi peneliti untuk menghasilkan suatu karya penelitian yang dapat menunjang sistem industri nasional serta infrastruktur Unsrat sebagai lembaga pendidikan tinggi menghasilkan sumberdaya berbudaya riset, yang dapat menjalankan sistem industri nasional serta infrastruktur pengembangan ilmu pengetahuan, teknologi, seni budaya ilmu sosial dan kemanusiaan. Unsrat sebagai universitas memiliki basis riset yang mengembangkan dan menerapkan teknologi serta mampu menciptakan nilai tambah maksimal untuk mencapai kesejahteraan masyarakat dan bangsa Indonesia.

Sejalan dengan salah satu prioritas bidang riset unggulan Unsrat yakni kemaritiman. penelitian ini akan mengeksplorasi dan mengeksploitasi sumberdaya laut (bakteri laut) pada perairan hydrotermal untuk dapat dimanfaatkan protease tahan panas yang dihasilkan. Sulawesi Utara memiliki beberapa sistem hidrotermal perairan laut yang merupakan habitat bakteri termofilik laut dengan keragamannya. Eksplorasi bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal penting dan terus dilakukan, mengingat permintaan akan protease tahan panas terus meningkat.

Ucapan terima peneliti sampaikan kepada Pimpinan Universitas Sam Ratulangi Manado, karena lewat dana penelitian ini dapat terlaksana. Begitu kepada semua pihak yang terkait sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

Manado, November 2018

Tim Peneliti

:

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB. 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	2
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1. Tujuan penelitian	4
3.2. Manfaat penelitian	4
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1. Penyegaran Inokulum	4
4.2. Isolasi DNA bakteri	5
4.3. Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR	5
4.4. Penentuan gen penyandi protease	5
4.5. Elektroforesis	5
4.6. Sekuensing	6
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	8
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	14
6.1. Pembuatan inokulum isokat bakteri protease	14
6.2. Penentuan waktu optimum protease	14
6.3. Produksi protease	14
6.4. Ekstraksi dan pemurnian protease	14
6.5. Uji aktivitas protease	15
6.6. Penentuan kadar protein	15
6.7. Penentuan pH dan suhu optimum protease	15
6.8. Penentuan pengaruh EDTA dan berbagai ion logam terhadap aktivitas protease	16
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	16
DAFTAR PUSTAKA	16

DAFTAR GAMBAR

Gambar	hal
1. Bagan alir kegiatan	7
2. Aktivitas protease bakteri termofilik yang ditunjukkan lewat terbentuknya zona bening	8
3. Hasil elektroforesis DNA bakteri	9
4. Amplifikasi DNA bakteri	9
5. Pohon filogeni isolate 2b, 4b, 9a dan 9b	12
6. Penyandi protease gen 16S 2b-FR	12
7. Penyandi protease gen 16S 2b-FR	13

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Hal
1. Foto kegiatan	19
2. Bukti jurnal status submission	21
3. Surat tugas	22

BAB 1. PENDAHULUAN

Bakteri tersebar luas di alam dan berada dalam populasi yang besar dan beragam. Penyebarannya sampai pada tempat-tempat dengan kondisi ekstrim seperti pH, salinitas dan suhu lingkungan yang tinggi atau rendah (Ambramowicz,1990). Bakteri yang mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan bersuhu tinggi dikenal sebagai bakteri termofilik. Suatu daya tarik tersendiri dari bakteri ini adalah kemampuannya untuk menghasilkan enzim yang stabil terhadap panas dan bahkan enzim yang dihasilkannya mampu mengkatalis reaksi kimia dengan cepat pada suhu tinggi (Friedman *dkk*, 1992).

Penggunaan bakteri termofilik dalam proses fermentasi industri (Van de Burg, 2003) memberikan beberapa keuntungan seperti pendinginan fermenter yang tidak diperlukan sehingga biaya fermentasi lebih rendah, banyak enzim yang disekresikan dan viskositas kaldu kultur bakteri yang rendah. Salah satu enzim yang dihasilkan oleh bakteri termofilik yang bersifat stabilitas terhadap panas adalah protease. Enzim ini bermanfaat untuk menghidrolisis protein. Enzim protease dapat dimanfaatkan diberbagai bidang seperti di bidang pertanian, industri, farmasi, makanan, kosmetik dan lingkungan.

Di perairan laut, bakteri termofilik dijumpai di sistem hidrotermal perairan dangkal dan di sumber air panas dasar laut. Beberapa hasil penelitian di perairan hidrothermal menunjukkan terdapat berbagai jenis bakteri termofilik diantaranya : *Thermus aquaticus*, *Bacillus caldolyticus* dan *Bacillus caldotenax* (Dwidjoseputro,1990). Eksplorasi tentang bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal telah dilakukan dan akan terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Sulawesi Utara memiliki beberapa sistem hidrotermal perairan laut yang merupakan habitat bakteri termofilik dan mengandung bakteri termofilik yang beragam. Salah satu sistem hidrotermal perairan laut tersebut adalah perairan pantai Moinit. Penelitian ini ingin mengungkap bakteri termofilik, khususnya penghasil protease dari perairan tersebut. Langkah awal yang perlu dilaksanakan adalah mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik tersebut. Identifikasi dilaksanakan secara konvensional yakni secara mikrobiologi dan identifikasi molekular lewat 16S rRNA sequencing yang dapat mengidentifikasi bakteri yang sulit untuk diidentifikasi dengan metode konvensional. Identifikasi molekular lewat 16S rRNA sequencing digunakan sebagai parameter sistematik molekular universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies.

Biakan bakteri memiliki kemampuan dapat memproduksi protease (Arastu-Kapur *et al.*, 2008). Ditinjau secara ekonomi enzim protease dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena mikroorganisme pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat

yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetika, serta mampu menghasilkan enzim yang dengan kondisi ekstrim (Singh *et al.*, 2016). Oleh sebab itu, produksi, ekstraksi, purifikasi dari protease sangat penting dalam pemanfaatan bakteri dan enzim yang dihasilkannya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang dapat hidup pada suhu 45 – 80 ° C, sedangkan bakteri hipertermofilik dapat hidup di atas 80°C. Kemampuan bakteri termofilik untuk hidup pada kisaran suhu yang tinggi umumnya disebabkan oleh enzim-enzimnya yang resisten atau stabil terhadap panas, baik enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme ataupun hidrolisis (Bergquist, *dkk.*,1987). Bakteri termofilik mengundang daya tarik untuk diaplikasikan dalam proses-proses industri fermentasi maupun dalam proses-proses bioteknologi lainnya. Khususnya enzim-enzim termofilik dikenal bersifat stabil panas dan mampu mengkatalisis berbagai reaksi dengan cepat pada suhu tinggi (Friedman 1992). Lacey (1990) berpendapat bahwa, pada industri fermentasi penggunaan bakteri termofilik sangat menguntungkan karena suhu yang tinggi meningkatnya laju difusi dan kelarutan substrat-substrat non-gas, sehingga meningkatkan efisiensi.

Salah satu enzim termofilik yang dihasilkan oleh bakteri termofilik adalah protease. Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini merupakan golongan hidrolase serta dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme dan mempunyai peranan yang penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward, 1983). Dewasa ini protease telah dieksploitasi secara komersial untuk membantu pemecahan protein dalam berbagai proses industri. Protease merupakan salah satu kelompok yang paling penting dari enzim industri yang secara luas digunakan dalam industri makanan, farmasi, hidrolisis protein, deterjen, pembuatan keju, bir, fotografi, baking, industri kulit juga digunakan dalam makanan hewan dan manusia untuk membantu proses bantu pencernaan (Synowiecki, 2010; Dias *dkk.*, 2008). Sekitar 75% dari penjualan dunia aplikasi enzim dalam dunia industri adalah enzim hidrolitik, yang mana sekitar 60% adalah enzim proteolitik (Ningthoujam dan Kshetri, 2010; Rai *dkk.*, 2010).

Protease yang diproduksi secara komersial mikroba. menawarkan sumber yang menarik dari protease karena dapat diproduksi dalam jumlah besar dalam waktu singkat dengan menggunakan teknik fermentasi (Dabananda dan Kshetri, 2010). Selain itu, produk protein yang dihasilkan lebih stabil daripada yang dari tumbuhan dan hewan.

Bakteri termofilik telah menjadi sumber yang menarik untuk enzim industri termostabil (Van den Burg, 2003). Enzim termostabil menunjukkan tingkat yang lebih tinggi dari perlawanan terhadap protein denaturasi misalnya, deterjen, pH ekstrim dan pelarut organik bila dibandingkan dengan enzim mesofilik analog. *Bacillus* sp merupakan bakteri proteolitik termofilik yang telah berhasil diidentifikasi, diisolasi dari hot spring of Tarabalo, Odisha, India (Panda *dkk*, 2012). Wilson dan Remigio (2012) telah berhasil mengkarakterisasi protease dari bakteri termofilik yang diisolasi dari hot spring, Zimbabwe.

Beberapa penelitian khususnya di Indonesia telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik seperti dari sumber air panas Plantungan Kendal (2009) dan Gunung Merapi (2012). Eksplorasi tentang bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal akan terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Sulawesi Utara memiliki beberapa perairan hidrotermal laut seperti perairan Likupang dan Moinit. Berdasarkan road map penelitian yang telah dilaksanakan, peneliti berhasil mengisolasi bakteri termofilik dari perairan hidrotermal pantai Moinit, Sulawesi Utara (2009). Bakteri tersebut dapat tumbuh pada suhu $> 60^{\circ}\text{C}$. Oleh sebab itu, peneliti ingin mengidentifikasi kemampuan bakteri termofilik tersebut dalam menghasilkan protease, mengidentifikasi jenis bakteri proteolitik termofilik tersebut guna memperoleh isolat murni bakteri proteolitik termofilik yang teridentifikasi dengan baik serta memproduksi, memurnikan dan mengkarakterisasi protease tahan panas dari bakteri termofilik tersebut.

Identifikasi bakteri secara molekular menggunakan teknik PCR. Teknik ini digunakan untuk menelaah profil DNA gen 16S-rRNA (Wang *dkk*, 2009). 16S rRNA sequencing sangat berguna dalam mengidentifikasi bakteri yang sulit untuk diidentifikasi dengan metode konvensional (Mignard and Flandrois, 2006). 16S-rRNA digunakan sebagai parameter sistematik molekular universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies.

Penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam pengembangan pemanfaatan protease termofilik dari bakteri yang diisolasi dari perairan pantai Moinit sebagai informasi substansi unggul. Hasil penelitian ini akan dipublikasikan pada jurnal internasional.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik yang diisolasi dari perairan hidrotermal pantai Moinit, Sulawesi Utara. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik dari perairan hidrotermal pantai Moinit secara molekular.
2. Mendapatkan isolat murni bakteri proteolitik termofilik.
3. Mengidentifikasi dan menentukan posisi filogen molekuler spesies bakteri proteolitik termofilik.
4. Mendapatkan enzim protease tahan panas.
5. Mengkarakterisasi enzim protease tahan panas.

3.2. Manfaat penelitian

Bakteri termofilik memiliki daya tarik karena kemampuannya menghasilkan enzim yang stabil terhadap panas seperti protease. Sulawesi Utara memiliki beberapa sistem hidrotermal perairan laut yang merupakan habitat bakteri termofilik dengan keragamannya. Salah satu sistem hidrotermal perairan laut tersebut adalah perairan pantai Moinit. Eksplorasi bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Penelitian bakteri termofilik penghasil protease dari perairan hidrotermal Sulawesi Utara penting dilaksanakan untuk mengeksploitasi keanekaragaman, mendapatkan isolat murni yang telah teridentifikasi, mendapatkan protease tahan panas yang telah terkarakterisasi sehingga nantinya dapat dikembangkan dan dimanfaatkan secara optimum, khususnya dalam bidang bidang industri.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini direncanakan untuk dilaksanakan dalam dua tahap/dua tahun; Fokus capaian pada tahun-1 adalah identifikasi molekular bakteri termofilik penghasil protease dari perairan hidrotermal pantai Moinit, Sulawesi Utara. Adapun tahapan pelaksanaan penelitian pada tahap ini adalah:

4.1. Penyegaran Inokulum

Setiap isolat bakteri proteolitik termofilik ditumbuhkan kembali pada media TMM cair ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01%; K_2HPO_4 , 0.1 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.35%; NaCl, 0.1 %; Yeast extract, 0.05%; Peptone, 0.05%). Bakteri yang tumbuh, diuji kembali aktivitas protease dengan

menumbuhkannya pada media TMMA yang mengandung protein. Kemampuan bakteri dalam menghasilkan protease ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh.

4.2. Isolasi DNA bakteri

Isolasi DNA terhadap setiap isolat bakteri yang berhasil diidentifikasi secara mikroskopik dan biokimia dilakukan dengan menggunakan Innuprep DNA mini kit (Biometra). Larutan DNA genom disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya digunakan pada tahap amplifikasi gen 16SrRNA.

4.3. Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR

Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5' TACCTTGTTACGACT-3'). Semua komponen reaksi dicampur ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Tahapan PCR terdiri dari pre-denaturasi 95 °C, 6 menit; tahap denaturasi 95 °C, 30 detik; tahap annealing 52 °C, 30 detik, tahap elongasi 72 °C selama 30 detik. Proses PCR terdiri dari 35 siklus. Selanjutnya *post* PCR pada suhu 72 °C selama 10 menit dan tahap *stop* PCR pada suhu 4°C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dielektroforesis.

4.4. Penentuan gen penyandi protease

PCR reaksi yang digunakan adalah 2KAPA Taq Extra Hot start ready Mix with dye dengan primer protease/keratinase (Kert) berupa forward primer Kert-F (GGTGTWYTWGSGTYGCKCCAARGC) dan reverse primer Kert-R (CTCCBGCWACRTGMGGAGAHGCCAT). Semua komponen reaksi dicampur ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Tahapan PCR terdiri dari pre-denaturasi 95 °C, 3 menit; tahap denaturasi 95 °C, 30 detik; tahap annealing 46-60 °C, 30 detik, tahap elongasi 72 °C selama 1 menit. Proses PCR terdiri dari 35 siklus. *post* PCR pada suhu 72 °C selama 1 menit dan tahap *stop* PCR pada suhu 4 °C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dielektroforesis. Pita yang menunjukkan gen penyandi protease dari hasil elektroforesis kemudian dipotong dan selanjutnya diekstraksi. Hasil ekstraksi DNA gen penyandi protease kemudian akan disekuens.

4.5. Elektroforesis

Gel elektroforesis disiapkan dengan 0,8 % agarose dalam 1x buffer TAE (0,24 gr agarose dalam 30 ml 1xTAE) (50x tris-asetat EDTA (TAE):1 l dH₂O, 242 gr Tris-basa, 37,2 gr Na₂EDTA, 57,1 ml asam asetat glasial), dipanaskan dan setelah larut didinginkan sampai 50°C kemudian dituang pada cetakan gel. Wadah yang sudah berisi gel diberi buffer 1x TAE secukupnya kemudian memasukkan sampel hasil digesti pada sumur-sumur gel. Pada waktu

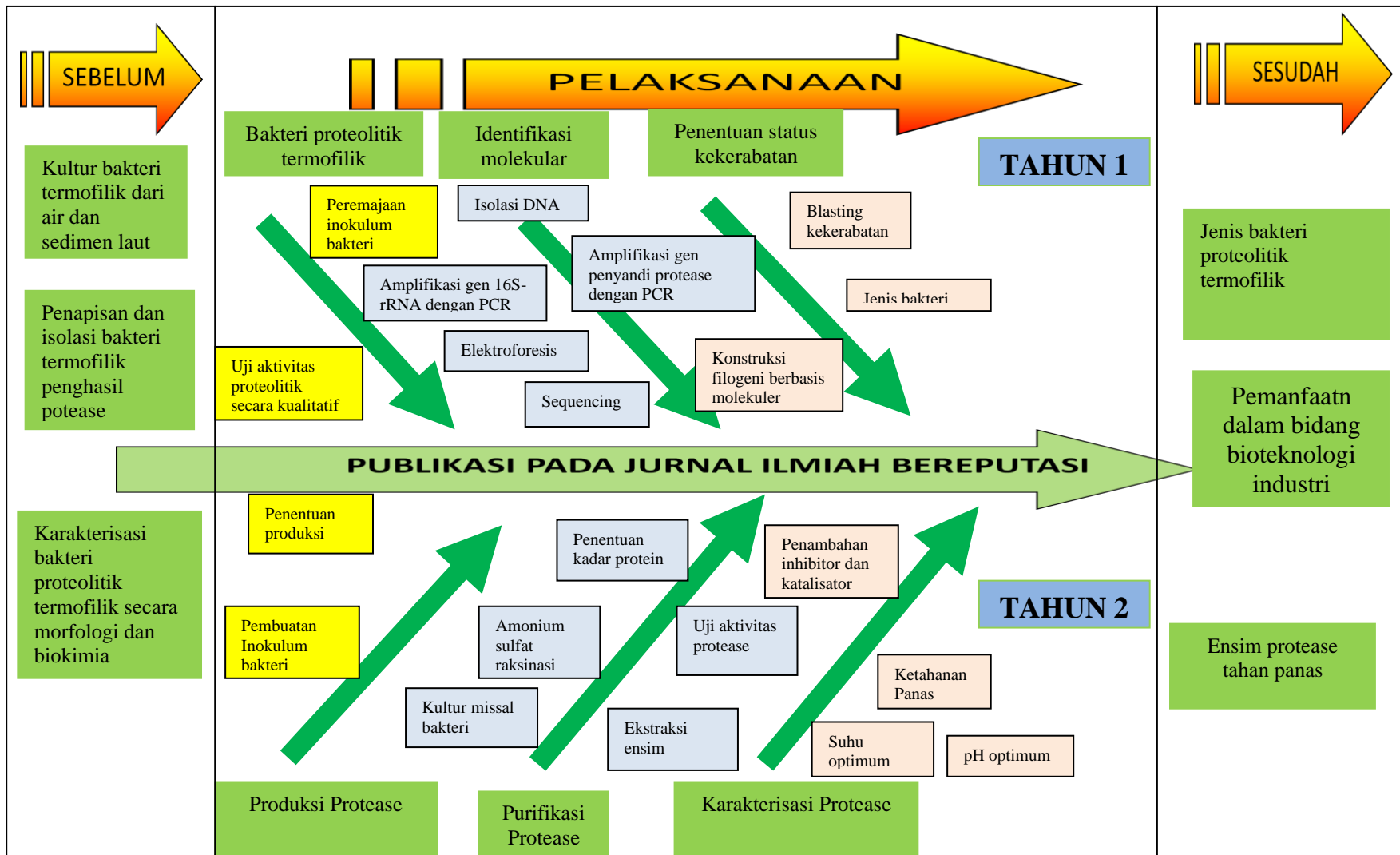
elektroforesis diberikan suatu marker atau penanda molekul DNA. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 30-40 Volt dan 28 – 29 mA dan diakhiri setelah bromofenol sampai tepi bawah gel (Aris, *dkk*, 2013). Hasil elektroforesis kemudian didokumentasi.

4.6. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Proses sekuensing dikirim ke laboratorium pelayanan analisis gen DNA. Sekuen DNA yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen data base *National Center for Biotechnology Informatioan* (NCBI) secara online pada situs GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Selanjutnya untuk melihat hubungan kekerabatan tiap-tiap isolat dengan beberapa bakteri dan evolusinya digunakan program Mega 7

Fokus capaian pada tahun-2 adalah ekstraksi, pemurnian dan karakterisasi protease tahan panas dari bakteri termofilik yang diisolasi dari perairan hidrotermal pantai Moinit. Hasil kajian yang diperoleh dalam seluruh tahapan penelitian ini akan menjadi acuan pengembangan dan pemanfaatan enzim tahan panas dalam bioteknologi industri.

Adapun bagan alir kegiatan penelitian ini disajikan pada Gambar 1.

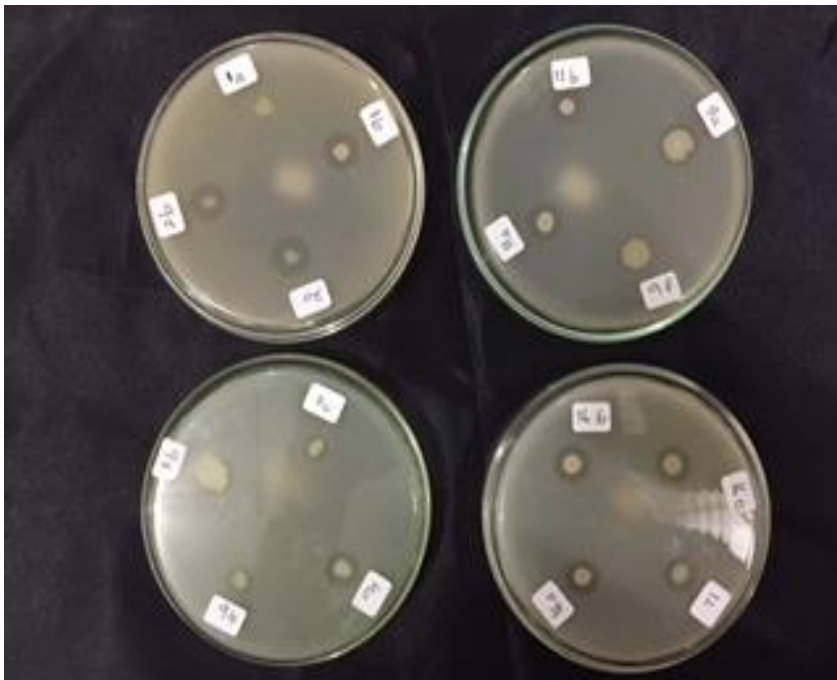


Gambar 1. Bagan Alir Kegiatan

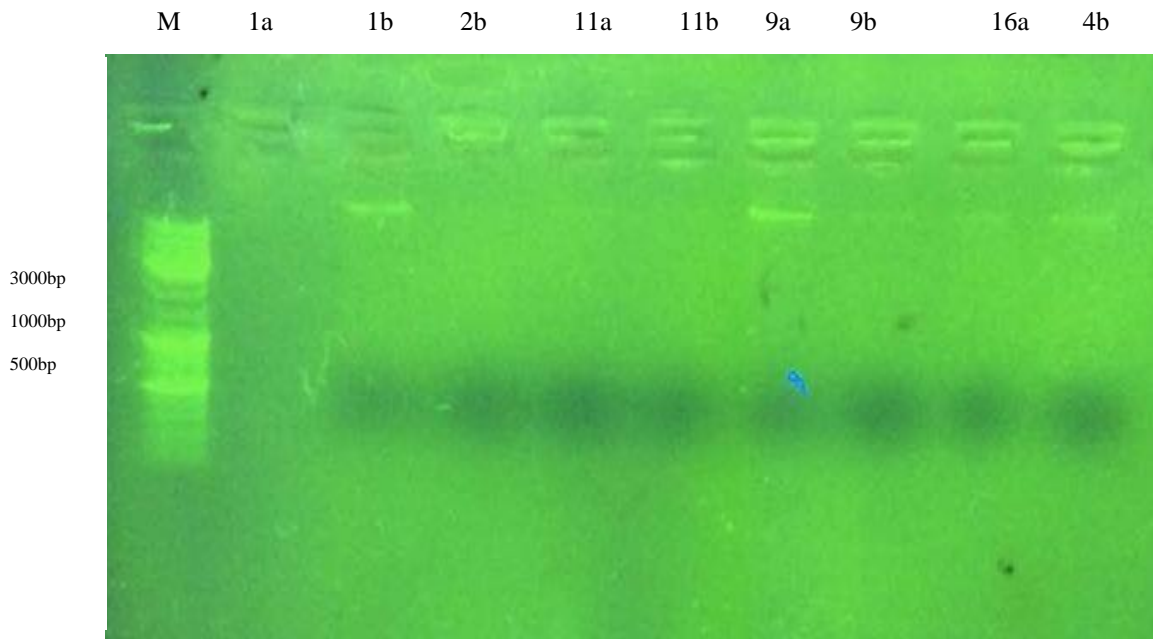
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Isolat bakteri penghasil protease yang telah disegarkan dan kultur kembali kemudian diuji kembali aktivitas protease. Terlihat bahwa isolate-isolat bakteri tersebut masih menunjukkan adanya aktivitas protease yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada media yang mengandung pati (Gambar 2). Isolat-isolat yang positif memiliki aktivitas protease kemudian di kultus dan diisolasi DNA nya. Keberhasilan isolasi DNA terlihat dari hasil elektroforesis (Gambar 3). Dari 9 isolat yang diisolasinya, terlihat bahwa 5 isolat berhasil diisolasi DNA nya dengan adanya pita yang terbentuk pada lintasan gel.

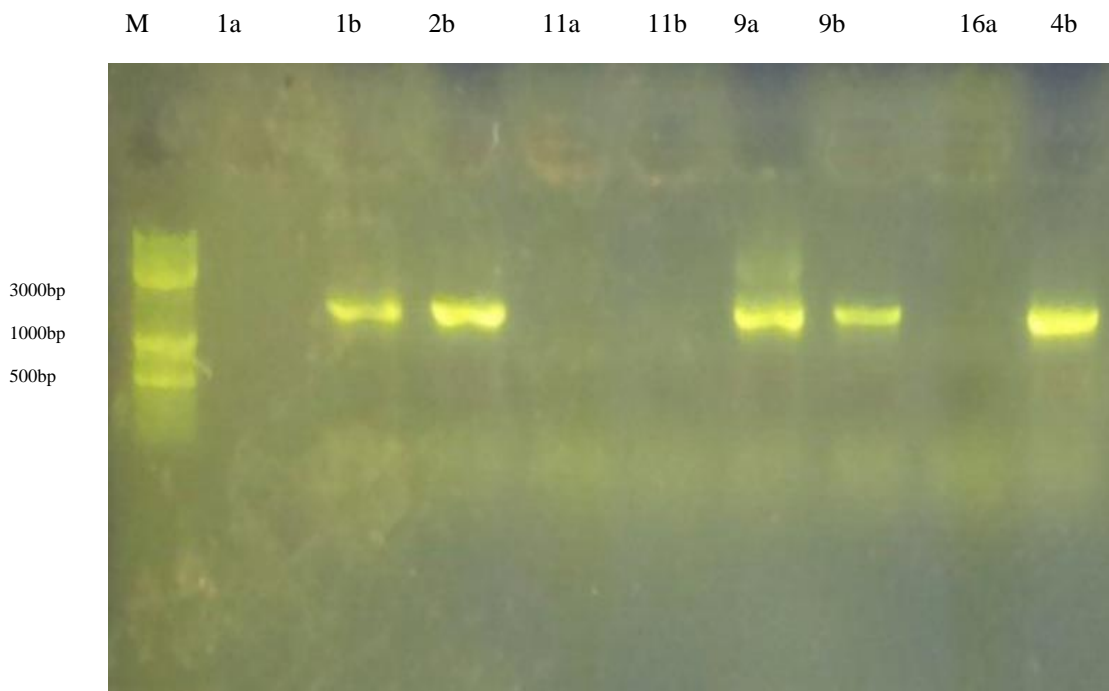
Lima isolate bakteri tersebut kemudian diamplifikasi menggunakan PCR dengan primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5' TACCTTGTTACGACT-3'). Kelima isolate tersebut berhasil diamplifikasi. Hal tersebut ditandai dengan adanya pita pada lintasan gel setelah dielektroforesis (Gambar 4). Pita tersebut berada pada sekitar 1400 bp yang menunjukkan DNA 16 sRNA bakteri.



Gambar 2. Aktivitas protease bakteri termofilik yang ditunjukkan lewat terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri



Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA bakteri



Gambar 4. Amplifikasi DNA bakteri

DNA hasil amplifikasi kemudian disequense. Dari hasil sequeance, 4 isolat yang menghasil hasil sequeance yang baik. Adapun hasil sequeance dari keempat isolate tersebut adalah sebagai berikut:

> Gen 16S-2b

CTCTCGTGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAGGGCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGGTGATCC
GCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTT
TTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGGAGCACGTGTGTAGC
CCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTC
ACCTTAGAGTGGCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGA
AGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGGTCTTCGCGTTGCTTCGAATT
AAACCACATGCTCCACCGCTTGGGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGGCGCCGT
ACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTT
AGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGTTTCGCGC
CTCAGTGTACGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATT
CACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCC
ACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAA
TTCCGATAACGCTTCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCT
GGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTT
ACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGAT
TCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTC
CATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAAATTTGGAACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGT
ATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTC
CGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATCGCTCGACTGCA

>Gen16S-4b

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTG
AACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAAGTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGC
GAAAGCGTGGGAGCGAAGCAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGACGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACG
GTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC
CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCCGAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACA
AATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA
GTTTGTAAACCCGAAGTCGGTG

>Gen 16S-9a

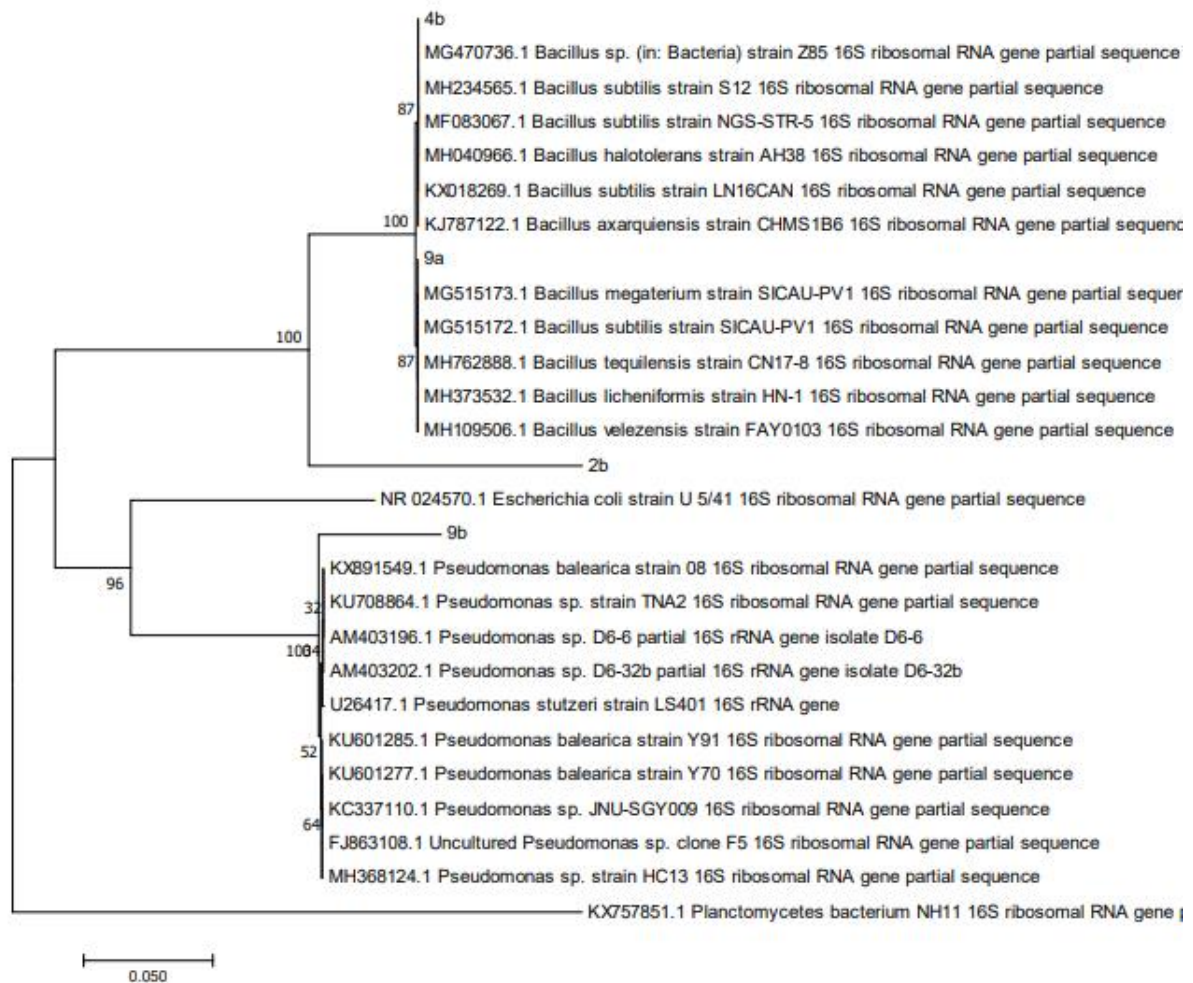
TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTG
AACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAAGTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGC

GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC
CCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACA
AATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA
GTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGA

>Gen 16S-9b

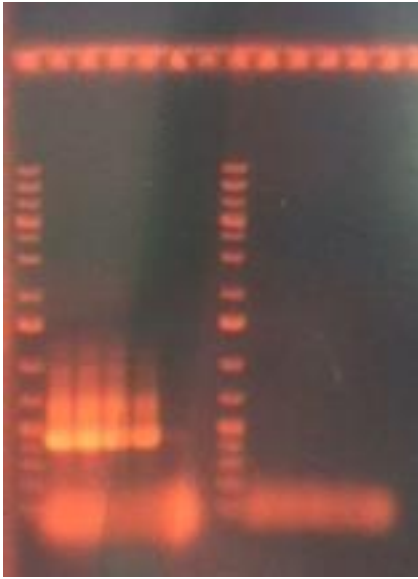
TAGACTAACTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAGGGCCGG
GAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCCACTTCCCGCAGTCCAGTTGC
AGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCCCGGCTTGGCAACCCTTT
GTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGGCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCCCGTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCTAACGGGCTGGTAACTAAAG
ACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATG
CAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGC
CTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC
AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTCGACTTAATGCGTTAGSTGCGCC
ACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGTCCCCACGTTTCGCACATCAGTGTGAGTATTAGCCCAGGTGGTTCGCTTCGCCAC
TGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCATGTGCCATACT
CTAGTCAGACAGTTTTGGATGCAATCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTATCAA
CCACATACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCTTCGTATTACC GCGGCT
GCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTTACT
GCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTCCAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGG
ATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGACCGTGTCTC
AGTTCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTACCTC
ACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGGTAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCCGCTTCTCC
CGTAGGACGTATGCGGTATTAGCTCGAGTTTCCCGAGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCCTA
GGCATTACTACCCGTCCGCCGCTCGCCGGCATCCCGAA

Berdasarkan hasil BLAST analysis dari sekuen 16S rDNA menunjukkan bahwa isolate 2b memiliki kesamaan dengan *Bacillus cereuens* (99% identity), 4b dan 9a memiliki kesamaan dengan *B. subtilis* (100% identity), dan 9b dengan *Pseudomonas balearica* (98% identity).

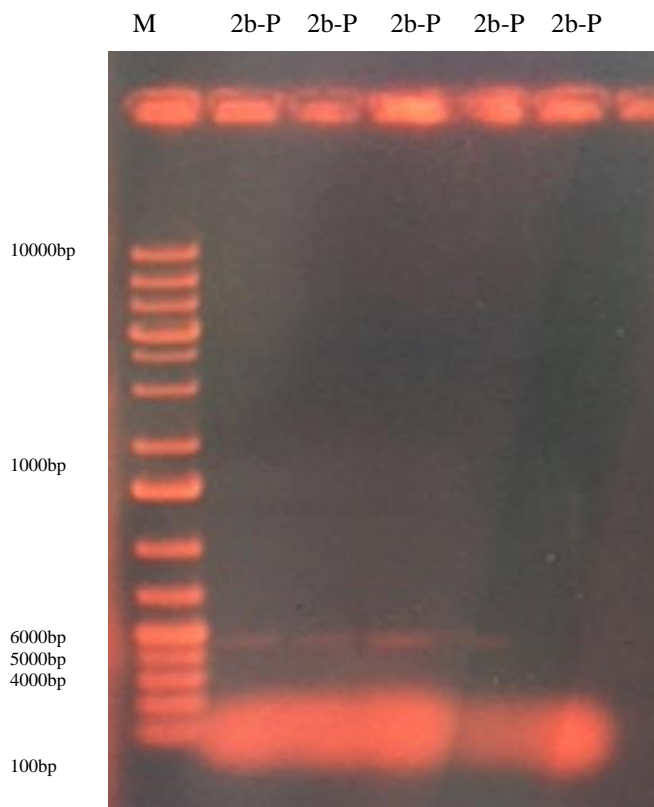


Gambar 5. Pohon filogeni isolate 2b, 4b, 9a dan 9b.

Lebih lanjut isolate bakteri 2b dipilih untuk menentukan gen penyandi protease dengan menggunakan primer protease/keratinase (Kert) berupa forward primer Kert-F (GGTGTWYTWGGSGTYGCKCCAARGC) dan reverse primer Kert-R (CTCCBGWCWACRTGMGGAGAHGCCAT). Gen penyandi protease berhasil diamplifikasi dengan terlihat adanya pita DNA pada lintasan gel. Hasil amplifikasi ini kemudian akan dikirim untuk menentukan sequence DNANYa.



Gambar 6. Penyandi protease Gen 16S 2b-FR



Gambar 7. Penyandi protease Gen 16S 2b-FR

Adapun luaran yang telah dicapai adalah jurnal yang telah dimasukkan (submitted) pada jurnal internasional terindeks scopus Bioflux.

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana penelitian tahapan selanjutnya pada tahun kedua meliputi: ekstraksi, pemurnian dan karakterisasi protease tahan panas dari bakteri termofilik yang diisolasi dari perairan hidrotermal pantai Moinit. Hasil kajian yang diperoleh dalam seluruh tahapan penelitian ini akan menjadi acuan pengembangan dan pemanfaatan enzim tahan panas dalam bioteknologi industri. Adapun tahapan pelaksanaan penelitiannya pada adalah sebagai berikut:

6.1. Pembuatan Inokulum Isolat Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri proteolitik yang sudah diremajakan pada media TMM miring diambil 1 ose dan diinokulasikan ke dalam 10 ml media TMM cair+2 % Skim Milk, kemudian diinkubasi selama 18 jam di atas shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 45°C.

6.2. Penentuan waktu produksi optimum protease.

Medium inokulum sebanyak 5% (v/v) dipindahkan secara aseptis ke dalam 100 ml medium cair (TMM), kemudian dikocok dengan alat pengocok horizontal (Kotterman) pada suhu kamar selama 48 jam. Waktu produksi optimum enzim ditentukan dengan melakukan uji aktivitas ekstrak enzim kasar pada jam ke-6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48. Waktu produksi optimum yang akan diperoleh digunakan untuk produksi enzim protease.

6.3. Produksi Protease.

Produksi protease akan dilakukan dengan cara memindahkan 5% (v/v) inokulum ke dalam 300 mL medium produksi (TMM). Medium produksi selanjutnya diinkubasi selama waktu produksi optimum pada suhu kamar.

6.4. Ekstraksi dan pemurnian protease.

Protease ekstraseluler akan diperoleh dengan sentrifugasi medium produksi pada kecepatan 5.000 g pada suhu 4°C, selama 15 menit. Supernatan berupa ekstrak enzim kasar akan dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat dengan konsentrasi 15, 30, 45, dan 60% jenuh. Ekstrak enzim kasar diukur volumenya, ditambah x gram amonium sulfat sampai konsentrasi akhir 15% jenuh (b/v), kemudian disentrifugasi. Supernatan ditampung, sedangkan endapan yang tertinggal dilarutkan dengan 5 ml NaCl 1% (b/v) dan disimpan pada suhu 4°C sebagai fraksi endapan 15% . Supernatan ditambahkan lagi amonium sulfat sampai konsentrasi akhir 30% jenuh dan disentrifugasi lagi. Supernatan ditampung, sedangkan endapan yang tertinggal dilarutkan dengan 5 ml NaCl 1% (b/v) dan disimpan pada suhu 4°C sebagai fraksi endapan 30% . Hal yang sama dilakukan dengan konsentrasi akhir amonium sulfat 45 dan 60%, sehingga diperoleh fraksi endapan 15, 30, 45, dan 60%. Fraksi-

fraksi endapan tersebut kemudian akan didialisis. Fraksi-fraksi hasil dialisis yang diperoleh diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

6.5. Uji aktivitas protease

Aktivitas enzim protease akan diukur dengan metode Bergmeyer dan Ward (1984) yang dimodifikasi. Substrat yang akan digunakan adalah Kasein Hammarsten 1 % sebagai induser dilarutkan kedalam buffer posfat (50 mM, pH 8). 1 ml substrat kemudian akan direaksikan dengan 1 ml enzim selama 10 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml asam trikloro asetat (TCA) 10 % inkubasi selama 10 menit pada suhu 50°C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Pada 1 ml supernatan ditambahkan Na₂CO₃ 0,5 M dan pereaksi Folin Ciocalteau's (1:2), campuran diinkubasi 20 menit pada suhu 50°C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Aktivitas protease akan ditentukan dengan cara menginterpolasikan nilai absorbansi dengan persamaan regresi dari kurva standar tirosin yang didapatkan. Blanko dibuat dengan cara yang sama, namun enzim diinaktifkan dahulu dengan direaksikan dengan 1 ml TCA. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 µmol tirosin permenit pada suhu dan pH optimum. (Sugiyono *et al.*, 2003)

6.6. Penentuan kadar protein

Penentuan kadar protein akan menggunakan metode Lowry 1964 *dalam* Bollag *et al*, 1996). Sebanyak 0,5 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 5 ml pereaksi C. Larutan-larutan tersebut dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambah Follin Ciocalteu sebanyak 0,5 ml, dikocok dan dibiarkan selama 30 menit. Serapan larutan akan diukur pada panjang gelombang 750 nm. Kontrol akan dibuat dengan campuran yang sama pada tabung sampel, tetapi larutan sampel diganti dengan akuades. Standar protein dibuat dengan memasukkan 0,5 ml kasein Hamerstein dalam bufer Tris-HCl ke dalam 6 buah tabung reaksi dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 mg per ml, selanjutnya perlakuan sama seperti sampel.

6.7. Penetapan pH dan suhu optimum protease

Penetapan pH optimum enzim akan dilaksanakan sama seperti uji aktivitas protease dengan variasi pH. Variasi pH yang akan dilakukan adalah 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10. Bufer pH yang akan digunakan adalah bufer natrium asetat untuk pH 4-5, bufer Na-fosfat untuk pH 6-7, bufer Tris-HCl untuk pH 8-9, dan bufer borax NaOH untuk pH 10. Sedangkan penetapan suhu optimum enzim akan dilaksanakan variasi suhu 45;50; 55; 60; 65; 70 dan 75°C, dengan menggunakan pH optimum dan inkubasi dilakukan bergantian.

6.8. Penentuan pengaruh EDTA dan berbagai ion logam terhadap aktivitas protease

Penentuan pengaruh penambahan EDTA dan ion logam (Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) akan ditentukan dengan menambahkan EDTA dan ion-ion logam masing-masing dengan konsentrasi 10⁻²M sebanyak 0,06 ml ke dalam larutan sampel sehingga konsentrasi akhir larutan pada saat uji aktivitas dilakukan adalah 10⁻³M. Sebagai pembanding aktivitas akan dilakukan uji pada sampel enzim tanpa penambahan EDTA dan ion-ion logam.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

Isolasi genomik telah berhasil dilakukan untuk isolate murni bakteri termofilik penghasil protease 2b, 4b, 9a dan 9b. Berdasarkan hasil BLAST analysis dari sekuence 16S rDNA menunjukkan bahwa isolate 2b memiliki kesamaan dengan *Bacillus cereuens* (99% identity), 4b dan 9a memiliki kesamaan dengan *B. subtilis* (100% identity), dan 9b dengan *Pseudomonas balearica* (98% identity).

Untuk pemanfaatan bakteri ini sebagai penghasil protease tahan panas, penelitian lanjutan tentang protease tahan panas yang dihasilkan perlu dilakukan. Oleh sebab itu disarankan agar protease tahan panas yang dihasilkan perlu dimurnikan dan dikarakterisasi guna pemanfaatan lanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambramowicz, D., 1990. Biocatalysis. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Arastu-Kapur, S., Ponder, E.L., Fonović, U.P., Yeoh, S., Yuan, F., Fonović, M., Grainger M., Phillips, C.I., Powers, J.C. and Bogyo, M., 2008. Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Natur Chemical Biology*, 4, pp. 203-213
- Berquist, P.L., D.R. Love, J.M. Croft, M.B. Streiff, R.M. Daniel dan W.H. Morgan, 1997. Genetic dan Potensial Biotechnological Applications of Thermophilic Microorganisms. *Biotechnol. Genet. Engineer. Rev.* 5:199-235. Intercept Ltd., Wimborne.
- Bergmeyer, J. and Grab, M. 1984. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Vol V. Enzymes 3: Peptidases, proteinases, and their inhibitors. Weinheim: Verlag Chemie. p. 270–276.
- Bollag, DM. and Edelstein, SJ. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc

- Dabananda, S.N. dan P. Kshetri P. 2010. A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant *Bacillus subtilis* strain SH1. Aust. J. Basic Appl. Sci. 10:5126-5134.
- Dias, D.R, Vilela, D.M, Silvestre, M.P.C dan R. F. Schwan. 2008. Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. World J. Microbiol. Biotechnol. 24:2027-2034.
- Dwidjoseputro, D., 1990. Dasar-dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan Jakarta.
- Friedman, S. M., 1992. Thermophilic Microorganisms. Encyclop. Microbial. 4: 217-229. Academic Press, Inc, New York.
- Lacey, J., 1990. Isolation of Thermophilic Microorganisms. Isolation of Biotechnological Organisms From Nature. McGraw-hill Publishing Company, New York. 115 hal.
- Marchesi, J.R, T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom dan W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ. Microbiol 64:795-9.
- Mignard S dan J.P.Flandrois. 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. J Microbiol Methods, 67: 574–581.
- Ninghoujam, D.S. dan P. Kshetri. 2010. A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant *Bacillus subtilis* strain SH1. Australian J. Basic Appl. Sci. 4:5126-5134.
- Panda, M.K., Sahu, M.K dan K. Tayung. 2012. Isolation and characterization of a Thermophilic *Bacillus* sp. With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. Iranian Journal of Microbiol. 5(2): 159-165.
- Rai, S.K, Roy, J.K dan A.K. Mukherjee. 2010. Characterization of a detergent-stable alkaline rotease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis* sp. Nov. AS-S24-II. Appl. Micrbiol. Biotechnol. 85:1437-1450.
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M. and Mehta, P.K., 2016. Microbial Proteases in Commercial Applications. Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 4(3), pp. 365-374
- Synowiecki, J. 2010. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. Afr. J. Biotechnol. 9: 7020-7025.
- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as source for novel enzymes. Curr. Opin. Microbiol. 6: 213-218.
- Ward, O. P. 1983. Proteinase. *Di dalam* Microbial Enzyme And Biotechnology. W. M. Fogarty. Applied Science Publisher. New York.

Wang, Z.Y., S.R. Shi, M.J. Xu dan H.M. Yang. 2009. 16sRNA-basil analysis of bacterial diversity in the microbial flora of the goose intestinal treat. *Journal of animal and feed sciences*. 18:531-540.

Wilson, P. dan Z. Remigio. 2012. Production and characterisation of protease enzyme produced by a novel moderate thermophilic bacterium (EP1001) isolated from an alkaline hotspring, Zimbabwe. *African Journal of Microbiology Research*. 6(27):5542-5551.

LAMPIRAN


Lampiran 1. Foto Kegiatan





Lampiran 2. Bukti jurnal status submission

11/22/2018 Email Universitas Sam Ratulangi - Article Submission

 **UNSRAT** Like Ginting <like.ginting@unsrat.ac.id>

Article Submission
4 pesan

Like Ginting <like.ginting@unsrat.ac.id> 12 November 2018 09.05
Kepada: ionelclaudiu@yahoo.com
Cc: zoobiomag2004@yahoo.com

Dear Dr. Gavrioie,


I am Elvy Like Ginting from Indonesia.
I send you a new article on Identification of Thermophilic Proteolytic Bacteria from Moinit Coastal Hot-Spring. North Sulawesi
to publish in AACL-Bioflux.
Thank you very much.


Sincerely yours,
Ir. Elvy Like Gintng, MSi., PhD

Lab. Biology Molecular and Marine Pharmaceutical
Faculty of Fisheries and Marine Science
Sam Ratulangi University
Indonesia 95115

Office/Fax : +62 431 868027
Mobile : +62 852 4125 3745,
Email : like.ginting@unsrat.ac.id

2 lampiran

 **Submission letter AACL Bioflux.pdf**
45K

 **BiofluxDraftJournal ELG et al.docx**
457K

Lampiran 3. Surat tugas



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SAM RATULANGI

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Alamat : Kampus UNSRAT Manado

Telp. (0431) 827560, Fax. (0431) 827560

Email: lppm@unsrat.ac.id Laman: <http://lppm.unsrat.ac.id>

SURAT TUGAS

Nomor: 1950/UN12.13/LT/2018

Ketua Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sam Ratulangi Manado, dengan ini menugaskan kepada:

1. Nama : Dr. Ir. Elvy Like Ginting, M.Si. (Ketua)
NIP : 196801111991032001
Pangkat Gol. : Pembina Tingkat I/IVb
Jabatan : Lektor Kepala
2. Nama : Dr. Veibe Warouw, S.Pi,M.Si (Anggota)
NIP : 197102271995122001
Pangkat Gol. : Penata Tingkat I/IIIId
Jabatan : Lektor
3. Nama : Kurniaty Kemer, SIK,M.Si (Anggota)
NIP : 198010312005012004
Pangkat Gol. : Penata/IIIc
Jabatan : Lektor

untuk melaksanakan Penelitian Riset Dasar Unggulan Universitas Sam Ratulangi (RDUU), yang di danai oleh dana PNBPN UNSRAT tahun 2018 dengan judul : ***"Identifikasi Molekuler Dan Karakterisasi Protease Dari Bakteri Termofilik Perairan Hidrotermal Pantai Moinit, Sulawesi Utara"***.

Demikian surat tugas ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Manado, 24 Mei 2018

Ketua,



Inneke F.M. Rumengan
NIP : 195711051984032001