

Pengaruh Nutrisi pada Produksi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Termofilik Isolat LS-1 Lumpur Sidoarjo

Achmad Toto Poernomo*, Isnaeni, Sugianto, Djoko Agus Purwanto, Ayu Chandra Dewi, Digdo Suryagama
Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: achmad-t-p@ff.unair.ac.id

Abstract

Background: Production of protease by thermophilic bacteria isolate LS-1 cultured in sodium citrate containing liquid media has been carried out. **Objective:** This study was aimed at getting optimum the condition of protease product in the thermophilic bacterial isolates of the Sidoarjo mud. **Methods:** Protease production is carried out at different times, temperature, carbon, and nitrogen sources. **Results:** The enzyme production reaches a maximum after incubation for 10 hours with activity of 1.85U/mg of protein. Some carbon sources needed for protease production in this study have been optimized. The soluble starch is the best substrate, followed by sodium citrate, citric acid and sucrose. NH_4NO_3 was the best among various source of organic and inorganic used. Protease characterization studies performed in this study indicate that the optimum temperature is 60°C. The enzyme was stable for 2 hours at 30°C, while at 40°C and 80°C it decreased by 16% and 86% respectively from the initial activity. Achievement of the optimum pH of the enzyme is known to be 8.0. After incubation of a crude enzyme solution for 24 hours at pH 5.5; 8.0 and 9.0, there was a decrease of about 49%, 15% and 63%, respectively, from previous activities. Effect of K^+ , Hg^{2+} and Cu^{2+} at a concentration of 1mM as a strong inhibitor resulting in loss of activity, was also observed in this study. The ions that contribute to influencing activity are Mn^{2+} and Ca^{2+} , which indicates that these ions have a functional role in the molecular structure of the enzymes. **Conclusion:** Optimum protease production by thermophilic bacteria at 10 hours. Dissolved starch is the best substrate for protease production. The optimum temperature and pH of protease activity were at 60°C and pH 8.0. Protease activity is influenced by Mn^{2+} and Ca^{2+} metal ions.

Keywords: protease, thermophilic bacteria, nutrition effect

Abstrak

Pendahuluan: Telah dilakukan produksi protease dari bakteri termofilik isolat LS-1 yang dikulturkan dalam media cair mengandung natrium sitrat. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum produksi protease pada isolat bakteri termofilik lumpur Sidoarjo. **Metode:** Produksi protease dilakukan pada berbagai waktu, sumber karbon dan nitrogen. Karakterisasi protease dilakukan dengan menggunakan substrat azokasein dengan pengaruh berbagai suhu, pH dan pengaruh ion logam. **Hasil:** Produk enzim mencapai maksimum pada 10 jam dengan aktivitas 1,85U/mg protein. Beberapa sumber karbon yang dibutuhkan untuk produksi protease dalam penelitian ini telah dioptimasi. Amilum adalah substrat terbaik, diikuti oleh natrium sitrat, asam sitrat dan sukrosa. Di antara berbagai sumber nitrogen organik dan anorganik NH_4NO_3 telah diketahui yang terbaik. Studi karakterisasi protease yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan suhu optimum pada 60°C. Enzim stabil selama 2 jam pada suhu 30°C, sementara pada suhu 40°C dan 80°C, menurun masing masing 16% dan 86% dari aktivitas awal. Pencapaian pH optimum enzim diketahui 8,0. Setelah larutan enzim kasar dinkubasi selama 24 jam pada pH 5,5; 8,0 dan 9,0, terjadi penurunan sekitar masing-masing 49%, 15% dan 63% dari aktivitas sebelumnya. Pengaruh K^+ , Hg^{2+} dan Cu^{2+} pada konsentrasi 1mM sebagai inhibitor kuat sehingga mengakibatkan hilangnya aktivitas. Ion yang berkontribusi mempengaruhi aktivitas adalah Mn^{2+} dan Ca^{2+} , yang menunjukkan bahwa ion ini memiliki peran fungsional dalam struktur molekul enzim. **Kesimpulan:** Produksi protease optimum oleh bakteri termofilik isolat LS-1 pada waktu 10 jam. Amilum adalah substrat terbaik untuk produksi protease. Suhu dan temperatur optimum aktivitas protease masing masing pada suhu 60°C dan pH 8,0. Aktivitas Protease dipengaruhi oleh ion logam Mn^{2+} dan Ca^{2+} .

Kata kunci: protease, bakteri termofilik, pengaruh nutrisi

PENDAHULUAN

Enzim yang berasal dari mikroba biasanya banyak digunakan untuk industri. Penggunaan bakteri untuk menghasilkan suatu enzim memiliki keuntungan baik secara teknik maupun ekonomi (Shumi dkk., 2004). Diantaranya keuntungan penggunaan mikroba sebagai penghasil enzim protease adalah waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek, tingkat pertumbuhan relatif lebih cepat, lebih mudah untuk ditumbuhkan, hasil lebih mudah ditingkatkan melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, biaya produksi relatif rendah, kondisi selama produksi, dan tidak tergantung oleh adanya pergantian musim (Naidu & Devi, 2005). Salah satu enzim yang penting dan memiliki nilai ekonomi tinggi adalah protease, karena aplikasinya sangat luas, diantaranya adalah untuk industri makanan, detergen, farmasi, kulit, dan pengolahan limbah. Protease dapat disekresikan pada bakteri termofilik sehingga semakin berguna dalam berbagai aplikasi komersial. Oleh karena itu, tidak mengherankan apabila protease digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia.

Protease merupakan salah satu enzim yang mampu memecah protein secara spesifik dengan mekanisme hidrolisis (Abou-Elela dkk., 2011). Penelitian yang mengarah pada produksi protease telah banyak dilakukan, terutama yang dihasilkan oleh mikroba, baik dari golongan jamur, *yeast* maupun bakteri. Bakteri termofilik juga merupakan salah satu jenis mikroba yang telah dilaporkan memproduksi protease (Imachi dkk., 2000; Chen & Chen, 2004). Oshima telah mengisolasi mikroba termofilik *Thermus thermophilus* pada tahun 1974 yang hidup pada suhu di atas 80°C. Temuan ini membuka peluang untuk mendapatkan protease termostabil yaitu protease yang stabil pada suhu tinggi (Maehara dkk., 2008; Ohtani dkk., 2010). Jika dibandingkan protease bakteri mesofil maupun penggunaan reagen katalisator kimia, protease termostabil yang dihasilkan oleh bakteri termofilik memiliki beberapa keuntungan antara lain menghasilkan reaksi yang lebih cepat, menurunkan kontaminasi mikroba lain, dan enzim akan tetap stabil pada temperatur tinggi. Temperatur yang tinggi diperlukan untuk meningkatkan kelarutan bahan dan menurunkan viskositas sehingga akan memudahkan transfer dalam proses produksi (Chen & Chen, 2004). Bakteri termofilik dapat hidup dan tumbuh pada suhu 30°C sampai 80°C, biasanya tumbuh optimum pada suhu 50°C sampai 65°C (Guangrong dkk., 2006). Bakteri termofilik mampu hidup di lingkungan yang panas

diantaranya adalah gunung berapi, kawah geotermal, dan sumber air panas.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme

Galur mikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri termofilik LS-1 isolat lumpur Lapindo Sidoarjo, yang diambil pada tahun 2010. Isolasi dilakukan menggunakan media Nutrient agar, dengan menimbang 10 g tanah disuspensikan dalam 90 mL media *nutrient broth*, dikocok selama 10 menit, selanjutnya diinokulasikan pada media Nutrien agar dengan cara *pour plate*. Setelah diinkubasi pada berbagai suhu, diperoleh suhu optimum pertumbuhan adalah 60°C.

Produksi protease

Media yang digunakan untuk produksi protease dalam penelitian ini mengandung (g/L air suling) 1,5 K₂HPO₄, 9,5 NH₄NO₃, 0,25 KCl, 0,45 MgSO₄, 0,9 pepton, 9 Na sitrat. Nilai pH diatur 6,9 - 7,0 dengan 1,0 M NaOH dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pepton disterilkan secara terpisah dan setelah dingin, secara aseptik ditambahkan ke Erlenmeyer yang berisi larutan berisi komponen media lain. Sebanyak 50 mL media produksi dalam labu Erlenmeyer 250 mL diinokulasi dengan 1 mL inokulum bakteri termofilik berumur 24 jam dan diinkubasi pada suhu 50°C dalam *rotary shaker* 150 rpm selama 12 jam. Pada interval waktu 24 jam, kekeruhan inokulum diukur dan dinyatakan sebagai *optical density* pada 470 nm dengan spektrofotometer. Sebelum uji, suspensi disentrifugasi pada 15.000 g selama 15 menit dan supernatan yang jernih digunakan untuk analisis enzim kasar.

HASIL DAN DISKUSI

Pengaruh nutrisi inokulum pada produksi protease

Media inokulum telah ditambahkan dengan *trace element* berikut (mg/ L) 0,21 CaCl₂, 0,2 NiCl₃.6H₂O, 0,025 FeCl₃.6H₂O, 0,15 MnCl₂.4H₂O, 0,024 COCl₂.6H₂O, 0,025 ZnO, 0,085 CuCl₂.2H₂O, 0,003 H₃BO₃ dan 0,001 Na₂Mo₄. Efek sumber karbon 1% (b/v) pada produksi juga diteliti dengan penambahan natrium sitrat, gliserol, D (+) galaktosa, laktosa, sukrosa, maltosa, amilum, D (+) glukosa, D (+) manose, L (+) arabinosa, kasein, D (+) xilosa dan asam sitrat. Sumber nitrogen yang berbeda termasuk NH₄NO₃, pepton, ekstrak ragi, ekstrak daging, kasein, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄Cl, KNO₃, urea dan NH₄ sitrat juga diteliti untuk produksi protease ekstraseluler.

Uji aktivitas protease

Aktivitas protease diuji replikasi tiga kali dengan mengukur pelepasan peptida yang larut. Asam trikloroasetat 0,4% (b/v), azocasein di 50 mM dalam dapar Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid) dalam NaOH (pH 7,5) pada 50°C selama 10 menit. Reaksi 1 mL dihentikan dengan penambahan 0,5 mL 15% asam trikloroasetat dan kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Satu unit (U) aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghidrolisis menghasilkan peningkatan produk pada absorbansi panjang gelombang 425 nm selama 60 menit. Protein diukur dengan metode Lowry, yang dimodifikasi oleh Petterson.

Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas protease

pH optimum ditentukan dengan substrat azocasein 1% (b/v) yang dilarutkan dalam dapar berbeda (fosfat sitrat, pH (5 - 6), natrium fosfat, pH 7,0, Tris-HCl, pH 8,0 dan glisin-NaOH, pH (9 - 13)). Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim ditentukan dengan pre-inkubasi enzim tanpa substrat pada pH yang berbeda (5,5 - 9,0) selama 24 jam pada suhu kamar dan mengukur aktivitas akhir pada suhu 60°C.

Pengaruh suhu pada aktivitas dan stabilitas protease

Pengaruh suhu pada aktivitas enzim ditentukan dengan melakukan prosedur uji standar pada pH 7,5 dalam rentang suhu dari 40 sampai 80°C. Stabilitas termal ditentukan dengan inkubasi enzim kasar pada suhu mulai dari 30 - 100°C untuk 2 jam dalam bak air suhu konstan. Setelah perlakuan, aktivitas enzim sisa diuji.

Pengaruh ion logam pada aktivitas protease

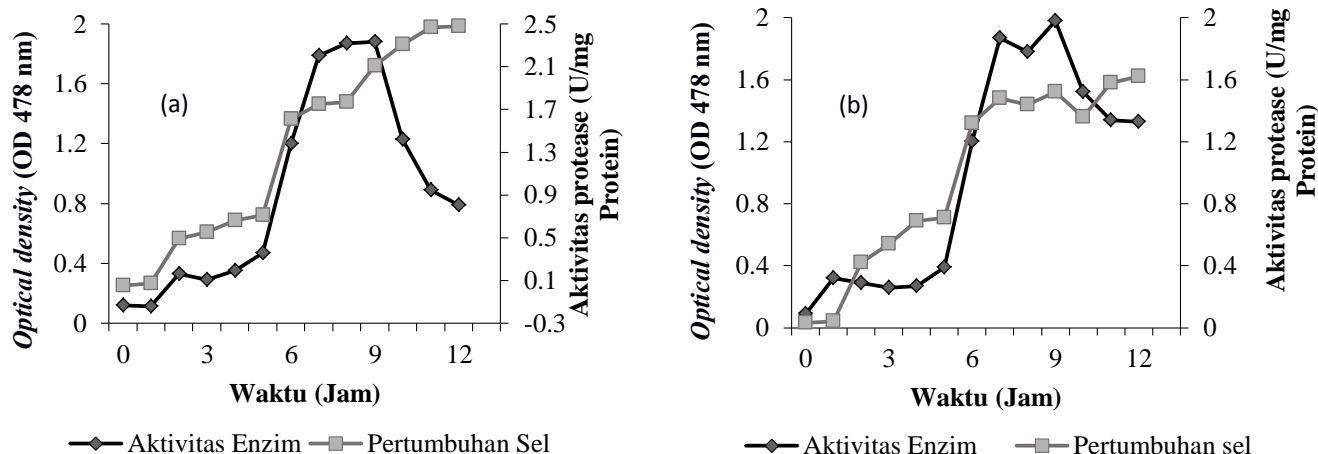
Pengaruh ion logam yang berbeda pada aktivitas protease ditentukan dengan penambahan ion yang sesuai pada konsentrasi akhir 1,0 mM ke dalam campuran reaksi, dan diuji dalam kondisi standar. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan adanya pengaruh KCl, CaCl₂, MgSO₄, FeSO₄, CoCl₂, ZnCl₂, MnSO₄, HgCl₂, CuSO₄ dan NaCl.

Pengaruh kondisi inokulum pada sekresi enzim

Pola pertumbuhan bakteri termofilik isolat LS-1 dan produksi protease diamati selama 12 jam dalam media cair dengan 1% trisodium sitrat sebagai sumber karbon dalam 250 mL labu Erlenmeyer (Gambar. 1a). Bakteri tumbuh sangat cepat dan pembentukan protease dimulai dari 5 jam pertumbuhan dan mencapai

maksimum di 10 jam (1,83 U/mg Protein) kemudian setelah itu aktivitasnya mulai turun. Hal ini menunjukkan bahwa produksi protease langsung terkait dengan inokulum menjadi aktif secara metabolik. Seperti telah dilaporkan oleh Ghorbel, bahwa *Bacillus cereus* BG1 biasanya menghasilkan protease selama akhir fase eksponensial. Fungsi enzim ini tidak jelas, tetapi produksinya berkaitan dengan terjadinya perubahan menjadi protein selama sporulasi (Ghorbel-Frikha dkk., 2005).

Pemberian suplemen pada media inokulum dengan larutan *trace element* meningkat secara bersamaan antara pertumbuhan bakteri termofilik isolat LS-1 dan produksi enzim (Gambar. 1b), sehingga menunjukkan persyaratan dari beberapa bahwa ion logam untuk produksi protease oleh bakteri ini. Hasil ini menguatkan temuan sebelumnya ion logam meningkatkan aktivitas protease (Veerapandian dkk., 2016). Ferrero dkk. (1996) melaporkan penggunaan natrium sitrat bersama dengan MgSO₄, CaCl₂, MnSO₄ dan ZnSO₄ untuk produksi protease dengan *Bacillus licheniformis* MIR 29. Meskipun penambahan larutan *trace element* untuk media meningkatkan pertumbuhan bakteri termofilik isolat LS-1 dan aktivitas protease, hilangnya aktivitas enzim ini pada inokulum fase diam telah diamati. Hasil ini mirip dengan temuan Janssen dkk. (1994), yang mengamati penurunan aktivitas proteinase dalam kultur *Thermus* sp. Rt41A. Ion Ca²⁺ memiliki efek stabilisasi yang signifikan pada protease maka khelator dan fosfat dapat menurunkan ion Ca²⁺ dalam kultur. Dengan demikian, memodifikasi media akan menghilangkan khelators, menurunkan kadar fosfat anorganik dan meningkatkan konsentrasi Ca²⁺ tanpa menimbulkan penurunan tingkat pertumbuhan sel bakteri. Bakteri termofilik isolat LS-1 mampu memanfaatkan berbagai sumber karbon, namun sumber karbon terbaik dalam penelitian ini untuk sekresi protease adalah amilum dan natrium sitrat (Tabel 1). Dalam penelitian serupa, Johnvesly & Naik (2001) menunjukkan bahwa asam sitrat, amilum dan natrium sitrat merupakan sumber karbon terbaik untuk produksi protease dengan *Bacillus* sp. JB-99. Menurunnya aktivitas enzim dengan adanya glukosa sebagai sumber karbon dalam penelitian tersebut, menunjukkan bahwa pembiakan organisme ini dalam 1% glukosa (b/v) akan menyebabkan produksi protease alkali ditekan sepenuhnya. Sebaliknya pada penelitian ini ditemukan bahwa glukosa menjadi sumber karbon yang relatif baik.



Gambar 1. Pertumbuhan dan produksi protease sebagai fungsi waktu fermentasi oleh bakteri termofilik isolat LS-1 tumbuh di 1,0% natrium sitrat (a) dan ditambah dengan trace element logam (b) dalam shaker incubator pada pH awal 7,0 dan pada 50°C.

Tabel 1. Pertumbuhan dan aktivitas protease oleh bakteri termofilik isolat LS-1 menggunakan sumber karbon yang berbeda. Kepadatan inokulum dan aktivitas protease ekstraseluler ditentukan setelah inkubasi 10 jam pada suhu 50°C dan pH awal 7,0

Sumber karbon	Densitas kultur (OD λ 470nm)	Aktivitas protease (U/mg Protein)
Natrium sitrat	0,98	1,11
Asam sitrat	0,47	0,78
Arabinosa	0,42	0,15
Fruktosa	0,52	0,22
Galaktosa	0,35	0,25
Xylosa	0,34	0,29
Laktosa	0,38	0,31
Kasein	0,42	0,33
Gliserin	0,92	0,36
Maltosa	0,23	0,45
Glukosa	0,54	0,53
Manosa	0,75	0,74
Sukrosa	0,68	0,76
Amilum	1,23	1,14

Jenis sumber nitrogen

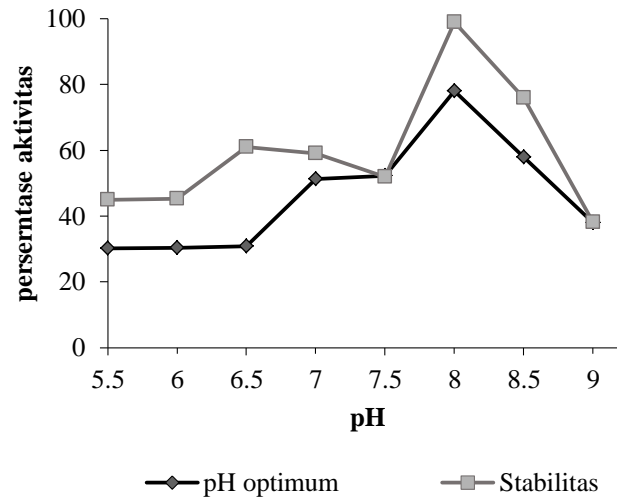
Di antara berbagai sumber nitrogen organik dan anorganik, aktivitas protease maksimum (1,1 U/mg protein) diperoleh ketika amonium nitrat digunakan dalam media (Tabel 2). Sedang untuk tingkat yang baik dari aktivitas enzim diperoleh ketika amonium klorida, amonium sitrat dan kalium nitrat digunakan sebagai sumber nitrogen.

Ketika berbagai sumber nitrogen organik diuji untuk produksi protease, ditemukan bahwa pembentukan protease oleh bakteri termofilik isolat LS-1 justru ditekan, meskipun pertumbuhan sel dalam beberapa penelitian sudah dapat meningkatkan produksi. Hasil yang sama diperoleh oleh Zacaria dkk.

(2010) ke *Aeromonas hydrophila* dan oleh Slapikoff dkk. (1971) untuk *Bacillus brevis*. Di sisi lain, Phadare dkk. (1993) melaporkan peningkatan produksi protease oleh sumber nitrogen organik seperti tripton, pepton dan ekstrak ragi. Sumber nitrogen organik telah ditemukan untuk menjadi sumber nitrogen yang lebih baik untuk pertumbuhan dan produksi protease dalam beberapa organisme dan sumber nitrogen anorganik (amonium sulfat dan kalium nitrat) memberikan hasil enzim yang lebih baik (Jani dkk., 2012; Ghorbel-Frikha dkk., 2005; Boominadhan dkk., 2009)

Tabel 2. Pertumbuhan dan produksi protease dengan bakteri termofilik isolat LS-1 menggunakan sumber nitrogen yang berbeda. Kepadatan kultur dan aktivitas protease ekstraseluler ditentukan setelah inkubasi 10 jam di 50°C dan pH awal 7,0

Sumber Nitrogen	Densitas Kultur	aktivitas enzim (U / mg Protein)
Tanpa tambahan	0,24	0,26
Pepton (1,0%)	1,47	0,06
Kasein (1,0%)	0,64	0,12
ekstrak yeast (1,0%)	1,42	0,14
(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,0%)	0,22	0,17
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (1,0%)	0,42	0,19
Pepton (0,1%)	0,61	0,26
Pepton (0,3%)	1,51	0,28
Pepton (0,2%)	1,12	0,42
Pepton (0,5%)	1,48	0,21
KNO ₃ (1,0%)	0,51	0,57
NH ₄ sitrat (1,0%)	0,56	0,72
NH ₄ Cl (1,0%)	1,00	0,77
NH ₄ NO ₃ (1,0%)	0,63	1,11
ekstrak daging (1,0%)	1,88	Tidak ada



Gambar 2. pH optimum dan stabilitas dari protease dengan bakteri termofilik isolat LS-1 tumbuh pada 50°C selama 10 jam. Aktivitas relatif dinyatakan sebagai persentase maksimum (100% dari aktivitas enzim = 0,8 U/mg Protein)

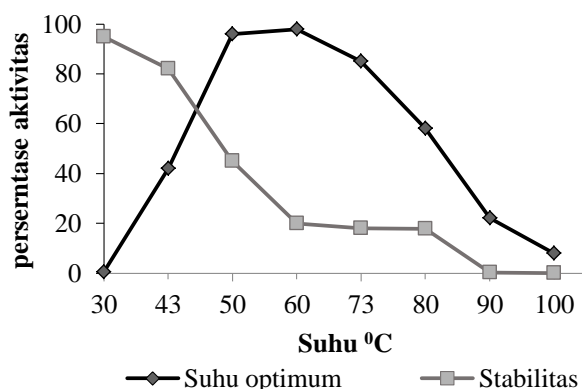
Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas protease

Berbagai pH antara 5,5 dan 9,0 digunakan untuk mempelajari pengaruh pH pada aktivitas protease (Gambar. 2). pH optimum ditemukan menjadi 8,0. Pada pH 6,5 hanya 29% dari aktivitas enzim maksimum diperoleh, meningkat menjadi 53% dan 59% pada pH 7,0 dan 7,5, masing-masing. Setelah inkubasi larutan enzim kasar pada suhu kamar selama 24 jam pada pH 5,5; 8,0 dan 9,0, diamati penurunan sekitar 51%, 18% dan 66% dari aktivitas semula, masing-masing. Sookkheo dkk. (2000) melaporkan tiga protease, S, N dan B dari termofilik *Bacillus stearothermophilus* TLS33, nilai pH optimum 8,5; 7,5 dan 7,0 masing-masing. Protease aktif pada rentang pH yang sangat luas, dan sekitar 60% dari aktivitas proteolitik masih terdeteksi pada pH 6 dan 10 dalam 5 mM CaCl₂. Sebaliknya, protease N dan B dipertahankan aktivitas yang relatif sedikit di atas pH 9,0.

Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas protease

Aktivitas protease diuji selama proses produksi enzim pada media produksi pada suhu 30 - 90°C dan

pada pH konstan 7,5 (Gambar. 3). Aktivitas enzim meningkat pada kisaran suhu 30 - 60°C dan menurun pada suhu di atas 60°C. Suhu optimum protease dicapai pada 60°C dan hasil ini mirip dengan yang dijelaskan oleh Beg dkk. (2003) untuk protease dari *Bacillus* sp. lainnya. Termostabilitas protease kasar yang diperoleh setelah proses pemisahan juga diuji dengan mengukur aktivitasnya pada 60°C, setelah inkubasi enzim tanpa substrat pada berbagai suhu antara 30 - 90°C selama 2 jam. Profil thermostabilitas menunjukkan bahwa enzim stabil pada suhu 30°C selama 2 jam sementara pada 40°C dan 80°C, masing-masing turun menjadi 14% dan 84% dari aktivitas semula. Berbeda dengan hasil penelitian Johnvesly & Naik (2001), protease dari *Bacillus* sp. JB-99 tetap 63% dan 25% dibandingkan aktivitas semula setelah perlakuan selama 1 jam pada suhu 70°C dan 80°C, namun dengan adanya 10 mM Ca²⁺, enzim dapat dipertahankan masing-masing 83% dan 74% dari aktivitas awal.



Gambar 3. Suhu optimum dan stabilitas dari protease dengan bakteri termofilik isolat LS-1 tumbuh pada 50°C selama 10 jam. Aktivitas relatif dinyatakan sebagai persentase maksimum (100% dari aktivitas enzim = 0,6 U/mg protein)

Pengaruh ion logam pada aktivitas protease

Pengaruh ion logam yang berbeda pada protease ditunjukkan pada Tabel 3. Efek penghambatan kuat diamati dengan adanya ion K^+ , Cu^{2+} dan Zn^{2+} . Ion Hg^{2+} menghambat sepenuhnya enzim pada konsentrasi 1 mM. Protease yang disekresi oleh *Bacillus brevis* juga dihambat oleh Hg^{2+} , Zn^{2+} dan Cu^{2+} (Slapikoff dkk., 1971). Efek penghambatan ion logam berat didokumentasikan dalam literatur. Hal ini diketahui bahwa ion merkuri, kadmium dan timbal bereaksi dengan kelompok protein thiol (mengkonversikan ke *mercaptides*) serta dengan histidin dan residu triptofan. Selain itu, dengan aksi perak dan merkuri, ikatan disulfida yang bersifat hidrolitik terdegradasi (Adinarayana dkk., 2003). Aktivitas protease distimulasi oleh Mn^{2+} dan Ca^{2+} . Hasil ini menunjukkan bahwa ion logam ini tampaknya melindungi enzim terhadap denaturasi panas dan memainkan peran penting dalam menjaga konformasi aktif enzim pada suhu yang lebih tinggi (Beg & Gupta, 2003). Efek yang sama dari Mn^{2+} pada aktivitas protease juga diamati oleh Rahman dkk. (1994). Aktivitas ini dinyatakan sebagai persentase dari tingkat aktivitas tanpa adanya ion logam. Enzim dipreinkubasi dengan ion logam (60°C, 5 min.) kosong terpisah dengan ion logam individu disiapkan.

Tabel 3. Pengaruh berbagai ion logam pada aktivitas protease

Ion logam	Aktivitas protease sisa (%)
Kontrol	100
$CaCl_2$	133
KCl	4
$ZnCl_2$	18
$HgCl_2$	0
$CoCl_2$	88
NaCl	23
$FeSO_4$	54
$MgSO_4$	61
$MnSO_4$	129
$CuSO_4$	12

KESIMPULAN

Produksi protease optimum oleh bakteri termofilik isolat LS-1 dicapai pada waktu 10 jam. Amilum adalah substrat terbaik untuk produksi protease. Suhu dan temperatur optimum aktivitas protease masing-masing pada suhu 60°C dan pH 8,0. Aktivitas protease dipengaruhi oleh ion logam Mn^{2+} dan Ca^{2+} .

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A. H., Hassan, S. W., Abd-Elnaby, H. & El-Toukhy, N. M. K. (2011). Alkaline Protease Production by Alkaliphilic Marine Bacteria Isolated from Marsa-Matrouh (Egypt) with Special Emphasis on *Bacillus cereus* Purified Protease. *African Journal of Biotechnology*; 10; 4631–4642.
- Adinarayana, K., Poluri, E. & Davuluri, S. (2003). Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *Journal of The American Association of Pharmaceutical Scientists*; 4; 1–9.
- Beg, Q. & Gupta, R. (2003). Purification and Characterization of an Oxidation-Stable, Thiol-Dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*; 32; 294–304.
- Boominadhan, Udandi, Rajendran, R., Palanivel, K., Vinayaga, S. & Manoharan, M. (2009). Optimization of Protease Enzyme Production Using *Bacillus* sp. Isolated from Different Wastes. *International Journal of Botany and Research*; 2; 83–87.
- Chen, K. & Chen, Z. (2004). Heat Shock Proteins of Thermophilic and Thermotolerant Fungi from Taiwan. *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei*; 45; 247–257.
- Ferrero, M. A., Castro, C. M., Abate, M. D., Baigori & Siñeriz, F. (1996). Thermostable Alkaline Proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, Production and Characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 45; 327–332.
- Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L. & Nasri, M. (2005). Production and Purification of a Calcium-Dependent Protease from *Bacillus cereus* BG1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 32; 186–194.
- Guangrong, H., Tiejing, Y., Po, H. & Jiaying, J. (2006). Purification and Characterization of a Protease from Thermophilic *Bacillus* Strain HS08. *African Journal of Biotechnology*; 5; 2433–2438.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A. & Harada, H. (2000). Cultivation and In Situ Detection of a Thermophilic Bacterium Capable of Oxidizing Propionate in Syntrophic Association with Hydrogenotrophic Methanogens in a Thermophilic Methanogenic Granular Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*; 66; 3608–3615.
- Jani, S. A., Chaitanya, Chudasama, J., Deval, B. P., Parul, S. B. & Harshad, N. P. (2012). Optimization of Extracellular Protease Production from Alkali Thermo Tolerant Actinomycetes: *Saccharomonospora viridis* SJ-21. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences Online*; 1; 84–92.
- Janssen, P. H., Peek, K. & Morgan, H. W. (1994). Effect of Culture Conditions on the Production of an Extracellular Proteinase by *Thermus* Sp. Rt41A. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 41; 400–406.
- Johnvesly, B. & Naik G. R. (2001). Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically Defined Medium. *Process Biochemistry*; 37; 139–144.
- Maehara, Tomoko, Takayuki, H. & Akira, N. (2008). Characterization of Three Putative Lon Proteases of *Thermus thermophilus* HB27 and Use of Their Defective Mutants as Hosts for Production of Heterologous Proteins. *Extremophiles*; 12; 285–296.
- Naidu, K. S. B. & Devi, K. L. (2005). Optimization of Thermostable Alkaline Protease Production from Species of *Bacillus* Using Rice Bran. *African Journal of Biotechnology*; 4; 724–726.
- Ohtani, Naoto, Masaru, T. & Mitsuhiro, I. (2010). An Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*, Is a Polyploid Bacterium. *Journal of Bacteriology*; 192; 5499–5505.
- Phadatare, Sangita, U., Vasanti, V. D. & Mandyam, C. S. (1993). High Activity Alkaline Protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme Production and Compatibility with Commercial Detergents. *Enzyme and Microbial Technology*; 15; 72–76.
- Rahman, Raja, N. Z., Che, N. R., Kamaruzaman, A., Mahiran, B., Wan, M. Z. Y. & Abu, B. S. (1994). Applied Microbiology Biotechnology Purification and Characterization of a Heat-Stable Alkaline Protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 40; 822–827.
- Shumi, W., Towhid, H. & Anwar, M. N. (2004). Proteolytic Activity of a Bacterial Isolate *Bacillus fastidiosus* Den Dooren de Jong. *Journal of Biological Science*; 4; 370–374.

- Slapikoff, S., Spitzer, J. L. & Vaccaro, D. (1971). Sporulation in *Bacillus brevis*: Studies and Protein Turnover Protease. *Journal of Bacteriology*; 106; 739–44.
- Sookkheo, B., Supachok, S., Suree, P. & Shui, T. C. (2000). Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*; 20; 142–151.
- Veerapandian, B., Ponnusami, V. & Sugumaran, K. R. (2016). Enhanced Thermo-Stability of Bacterial Alkaline Protease by Calcium Ions. *Der Pharmacia Lettre*; 8; 192–96.
- Zacaria, J., Delamare, A. P. L., Costa, S. O. P. & Echeverrigaray, S. (2010). Diversity of Extracellular Proteases among *Aeromonas* Determined by Zymogram Analysis. *Journal of Applied Microbiology*; 109; 212–219.