

## Biodegradability of Proteolytic Bacteria in Mangrove Ecosystems

Kristiwany Mayneke Claudia<sup>1\*</sup>, Nursyirwani<sup>1</sup>, Irwan Effendi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Marine Science, Faculty of Fisheries and Marine Universitas Riau  
Corresponding Author: kristiwanymeynekeclaudia@gmail.com

Diterima/Received: 20 April 2021; Disetujui/Accepted: 30 April 2021

### ABSTRACT

The purpose of this study was to awareness the optimal time for the growth of proteolytic bacteria in producing the protease enzyme and determine the effectiveness of the protease enzyme from proteolytic bacteria in degrading mangrove litter. The method used was the experimental method by using two proteolytic bacteria isolates, namely *Bacillus manliponensis* (K6) and *Bacillus toyonensis* (K20). This method used one treatment for each proteolytic bacterial isolate, namely the addition of different extract containing protease enzyme (0%, 25%, and 50%) with three replications. Measurement of bacterial growth was carried out every 6 hours for 24 hours using Total Plate Count (TPC) and spectrophotometric method. *B. manliponensis* and *B. toyonensis* have enzyme activity as indicate by the presence of a clear zone on Zobell Marine Agar 2216 and skim milk 1%. The growth bacteria based on the TPC measurement was directly proportional to the spectrophotometric measurement results. The highest bacterial count was  $(1.39 \times 10^8 \text{ CFU's/ml})$  K6 bacteria and  $(1.52 \times 10^8 \text{ CFU's/ml})$  K20 bacteria. The results of the measurement of cell growth in the spectrophotometric method occurred at the 6th hour, namely  $10.36 \times 10^8 \text{ CFU's/ml}$  (K6 bacteria) and  $10.97 \times 10^8 \text{ CFU's/ml}$  (K20 bacteria). The optimum time of the protease enzyme occurred at 6 hours, which was 0.0258 mg/ml (K6 bacteria) and 0.0262 mg/ml (K20 bacteria). The highest dissolved protein content was obtained at the 50% dose of 0.054 mg/ml (K6 bacteria) and 0.055 mg/ml (K20 bacteria), while the lowest was at 0%, namely 0.050 mg/ml (K6 bacteria) and 0.051 mg/ml (K20 bacteria).

**Keywords:** Biodegradation, Growth, Proteolytic Bacteria, Protease Enzyme, Dissolved Protein

### 1. PENDAHULUAN

Ekosistem mangrove merupakan ekosistem antara daratan dengan ekosistem lautan, sehingga ekosistem mangrove mempunyai fungsi yang spesifik dengan berlangsungnya tergantung pada dinamika yang terjadi di ekosistem daratan maupun lautan (Olii *et al.* 2015; Syarial *et al.* 2018). Berdasarkan penelitian Naibaho *et al.*, (2015), serasah daun *Avicennia marina* mengandung unsur hara karbon, nitrogen dan fosfor. *A.marina* mengandung bahan organik karbon 47,93%, nitrogen 0,35%, fosfor 0,083%, kalium 0,81%, dan magnesium 0,49% sedangkan daun *Rhizophora apiculata* mengandung bahan organik karbon 50,83%, nitrogen 0,83%, fosfor 0,025%, kalium 0,35%, kalsium 0,75% dan magnesium 0,80%. Salah satu mikroorganisme yang berperan dalam proses dekomposisi adalah bakteri.

Negara industri maju sudah banyak mengekstraksi enzim dari berbagai mikroorganisme. Aktivitas enzim yang dihasilkan dari mikroorganisme yang tinggi dan

bersifat lebih stabil dibandingkan yang berasal dari tumbuhan atau hewan. Contoh dari enzim tersebut adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan dari bakteri seperti amilase, protease, lipase dan selulase.

Berbagai penelitian telah banyak dilakukan pada ekosistem mangrove, antara lain mengenai mikrobiota, nutrisi dan analisis logam berat. Namun penelitian mikrobiologi mengenai mikroorganisme pendegradasi bakteri proteolitik masih belum banyak dilakukan, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai kemampuan biodegradasi dari isolat bakteri proteolitik pada ekosistem mangrove.

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk menentukan waktu optimum pertumbuhan sel bakteri dan produksi enzim protease dari bakteri proteolitik serta untuk menguji efektivitas enzim protease dari bakteri proteolitik dalam mendegradasi serasah mangrove.

## 2. METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2020. Sampel serasah mangrove diambil dari areal hutan mangrove Stasiun Kelautan Kelurahan Purnama Kota Dumai Provinsi Riau. Uji kemampuan degradasi bakteri proteolitik terhadap serasah mangrove dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laut Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau.

### Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, yaitu menguji kemampuan isolat bakteri proteolitik dalam mendegradasi bahan organik dari serasah mangrove. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor, dengan 1 (satu) perlakuan yaitu penambahan dosis enzim protease berbeda (0%, 25% dan 50%). Percobaan dilakukan dengan tiga kali ulangan.

### Prosedur Penelitian

#### Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebagai langkah awal dalam mempersiapkan pembuatan media. Hal ini dilakukan agar alat-alat yang digunakan steril dan bebas dari organisme-organisme patogen yang masih melekat pada alat tersebut. Peralatan yang digunakan seperti tabung reaksi, tabung erlenmeyer dibungkus dengan aluminium foil, cawan petri dibungkus dengan kertas padi lalu dimasukkan ke dalam keranjang yang telah disiapkan, keranjang dimasukkan ke dalam autoklaf untuk sterilisasi dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 atm dalam waktu 15 menit. Setelah proses autoklaf selesai, alat-alat tersebut dibiarkan kering kemudian disusun pada lemari penyimpanan.

#### Peremajaan Isolat Bakteri

Isolat yang digunakan adalah isolat bakteri proteolitik yaitu bakteri *B. manliponensis* (K6) dan bakteri *B. toyonensis* (K20) yang telah diisolasi dari sedimen hutan mangrove Stasiun Kelautan Kelurahan Purnama Kota Dumai Provinsi Riau (Zebua *et al.*, 2020). Isolat bakteri proteolitik yang digunakan diambil sebanyak 1 ose, kemudian diinokulasi ke dalam cawan petri berisi media Zobell Marine Agar yang ditambah *skim milk* 1%. Setelah itu biakan bakteri diinkubasi pada inkubator dengan suhu ruang selama 24 Jam.

### Uji Aktivitas Protease secara Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan media Zobell Marine Agar 2216 yang ditambah *skim milk* 1%. Suspensi bakteri proteolitik yang telah diremajakan diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media Zobell Marine Agar dan *skim milk* lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jika terbentuk zona bening disekitar koloni, hal tersebut menunjukkan bahwa adanya aktivitas proteolitik.

### Pembuatan Suspensi bakteri

Bakteri yang digunakan dalam pengujian dibuat dalam bentuk suspensi, diambil menggunakan jarum ose, dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang telah berisi larutan NaCl fisiologis. Campuran kemudian dihomogenkan dengan vortex. Kekeruhan campuran dibandingkan dengan kekeruhan *McFarland 0,5 Standard* yang setara dengan  $10^8$  CFU/mL.

### Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland

Prosedur pembuatan larutan standar McFarland dalam penelitian ini yaitu dengan memasukkan  $\text{BaCl}_2$  terlebih dahulu lalu ditambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sesuai komposisi dari skala McFarland, kemudian larutan divortex dan ditutup dengan aluminium foil lalu disimpan pada suhu ruang. Skala standar McFarland yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,5 dengan komposisi 0,05 ml  $\text{BaCl}$  1% + 9,95 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% dengan perkiraan jumlah bakteri pada suspensi  $1,5 \times 10^8$  CFU's/ml dan nilai absorbansi (*Optical Density*) 0,8 sampai 1 (DALYNN Biological, 2014).

### Pertumbuhan Bakteri dan Waktu Optimum Produksi Enzim Protease

Penentuan waktu optimum produksi protease diawali dengan penentuan waktu pertumbuhan bakteri pada inokulum yang digunakan. Penentuan waktu pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengkultur 10 mL suspensi bakteri ke dalam 100 mL media cair yang ditambahkan *skim milk* 1%. Kultur diinkubasi pada suhu 50°C menggunakan *water bath shaker* dengan kecepatan 90 rpm. Pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan 2 (dua) cara yaitu metode TPC dan metode spektrofotometri.

Teknik yang digunakan pada metode TPC dalam penelitian ini yaitu teknik cawan

sebar (*spread plate*). Langkah pertama dalam metode ini yaitu menyiapkan media PCA (*Plate Count Agar*) yang telah dibuat, disterilkan dan ditempatkan pada cawan petri secara aseptis (Effendi, 2020). Sampel bakteri pada media pertumbuhan diencerkan terlebih dahulu sampai pengenceran  $10^{-5}$ , kemudian 0,1 ml diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media PCA. Sampel bakteri pada media kemudian disebar dan diratakan menggunakan batang *drigalski* secara aseptis di dekat bunsen, setelah itu sampel bakteri diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator kemudian koloni bakteri yang tumbuh pada media PCA dihitung menggunakan *Colony counter*. Hasil jumlah koloni yang didapat kemudian dimasukkan kedalam rumus perhitungan bakteri berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Tyas *et al.* (2018), yaitu:

$$CFU = \frac{1}{\text{Vol. sampel} \times \sum \text{faktor pengenceran}} \times \sum \text{koloni}$$

Metode spektrofotometri ini menggunakan spektrofotometer untuk mengukur jumlah sel bakteri dengan cara melihat kekeruhan suspensi sampel bakteri. Sampel bakteri pada media diambil dan dimasukkan kedalam kuvet, kemudian kuvet diletakkan dalam spektrofotometer dan diukur nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 630 nm. Panjang gelombang 630 nm digunakan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Imron dan Purwanti (2016) yang mengukur pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai absorbansi dikonversikan kedalam rumus regresi linear yang telah didapat dari data kurva standar McFarland, hingga didapat nilai kepadatan sel pada media sebagai hasilnya.

Pengukuran pertumbuhan bakteri dan waktu optimum produksi enzim dilakukan pada jam ke 0, 6, 12, 18 dan 24 untuk diukur nilai *Optical Density* (OD) pada  $\lambda$  630 nm menggunakan spektrofotometer dan setiap kali pengukuran dilakukan juga pengujian aktivitas enzim protease pada  $\lambda$  595 nm. Setelah itu, dibuat kurva pertumbuhan bakteri untuk menentukan waktu pertumbuhan bakteri tersebut. Waktu pertumbuhan dengan aktivitas enzim protease tertinggi digunakan sebagai waktu optimum produksi enzim protease.

### Produksi Enzim Protease

Enzim protease dipanen selama waktu produksi tertinggi yang telah didapatkan sebelumnya yaitu pada jam ke 6. Kultur sel pada media produksi yang mengandung enzim protease ekstraseluler disentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan supernatant yang mengandung enzim dengan pellet bakteri. Supernatant hasil sentrifugasi diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dan kemudian disimpan pada suhu  $10^{\circ}\text{C}$  sebagai ekstrak kasar enzim protease.

### Uji Kemampuan Bakteri dalam Mendegradasi Serasah Mangrove

Percobaan didesain menggunakan Rancangan Acak Lengkap, terdiri atas 1 (satu) perlakuan dan tiga kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian dosis ekstrak kasar enzim protease yang berbeda (0%, 25% dan 50%). Preparasi substrat (daun mangrove) dilakukan dengan cara substrat direndam dengan air selama 24 jam dan dikeringkan pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  dalam oven selama 3 hari. Kemudian substrat dihaluskan menggunakan alat blender dan diayak menggunakan ayakan 100 *mesh size*. Sebanyak 10 g substrat dimasukkan ke dalam botol sampel yang berisi 50 mL akuades. Substrat diinkubasi menggunakan *water bath shaker* dengan kecepatan 90 rpm selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan enzim kasar protease sesuai perlakuan, dan kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ . Substrat disentrifus untuk mendapatkan ekstrak kasar substrat dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Parameter yang diamati adalah kadar protein terlarut. Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) *Fraction V* sebagai standar protein. Sebanyak 20 mg BSA ditimbang dan ditambahkan 10 mL akuades. Larutan kemudian dihomogenkan dan diencerkan sampai 20 mL. Konsentrasi akhir larutan stok untuk standar ini adalah 1 mg/mL. Ekstrak kasar substrat dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 0.1 mL dan ditambahkan 1 mL pereaksi Bradford kemudian diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometri.

### Analisis Data

Data laju degradasi bahan organik oleh bakteri proteolitik disajikan dalam bentuk

grafik dan tabel. Kemudian data dijelaskan secara deskriptif yang didukung dengan referensi yang terkait dengan penelitian ini. Untuk melihat isolat bakteri yang telah diuji kemampuan mendegradasi protein digunakan uji ANOVA dengan menggunakan prinsip RAL (Rancangan Acak Lengkap). Jika nilai uji tidak signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji beda nyata (Newman-Keuls).

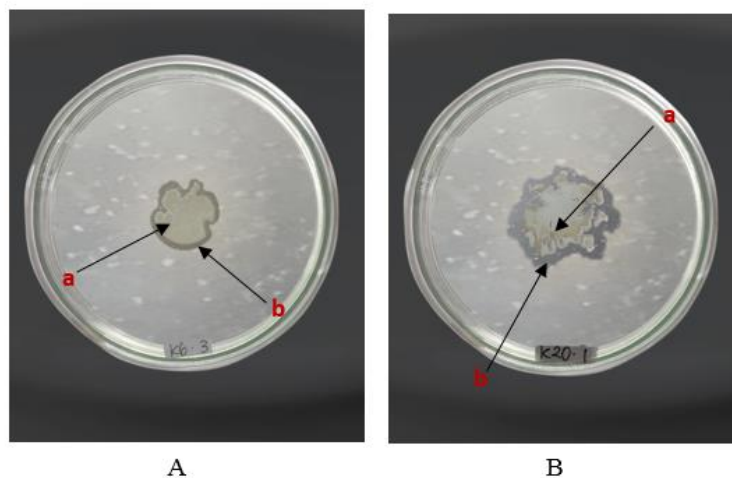
### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Uji Aktivitas Protease secara Kualitatif

Pada uji kualitatif ini terlihat bahwa

isolat K6 (*B. manliponensis*) dan K20 (*B. toyonensis*) menghasilkan zona bening disekitar koloni bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa isolat K6 dan K20 merupakan bakteri proteolitik atau mampu menghasilkan enzim protease (Gambar 1).

Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona bening di sekitar koloni dengan besarnya diameter koloni (Widhyastuti dan Dewi, 2001)



**Gambar 1. Uji aktivitas protease secara kualitatif isolat K6 (A) dan Isolat K20 (B)**

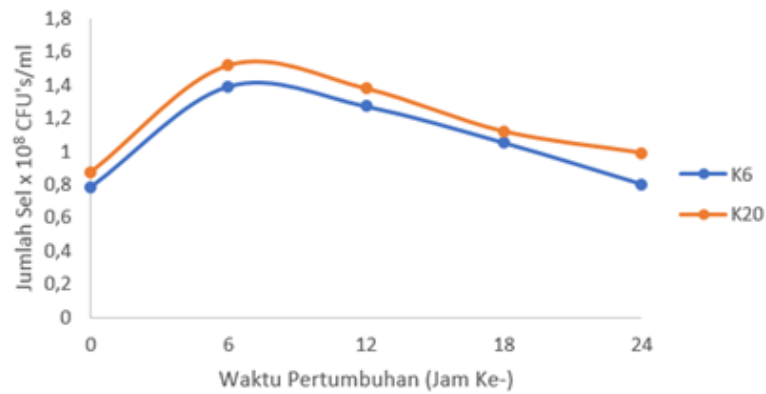
Keterangan: a. Koloni bakteri dan b. Zona bening

Zona bening yang dihasilkan merupakan hasil hidrolisis substrat protein yang terkandung dalam media ZMA oleh enzim protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Media ZMA mengandung susu skim yang ditambahkan sebagai sumber karbon utama bagi kebutuhan metabolisme bakteri. Isolat bakteri kemudian dijadikan sebagai starter pada proses produksi enzim protease.

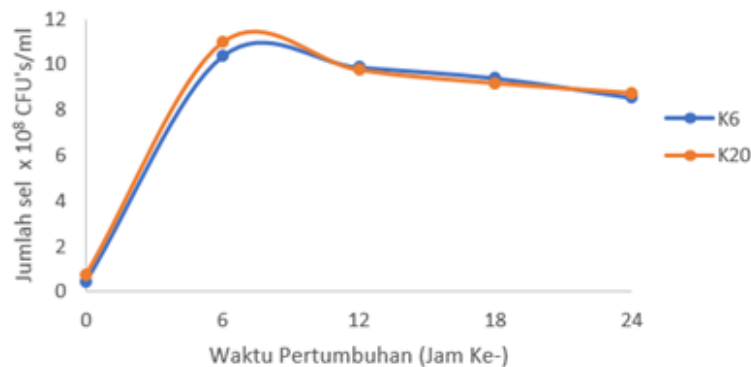
#### Pertumbuhan Sel Bakteri Proteolitik

Hasil pengukuran pertumbuhan bakteri dengan perhitungan metode TPC dan spektrofotometri dirata-ratakan berdasarkan 3 (tiga) ulangan yang kemudian disajikan dalam bentuk Gambar 2 dan Gambar 3 dengan nilai hasil yang dikali  $10^8$  dan satuan CFU's/ml. Berdasarkan hasil penelitian, isolat bakteri K6 dan K20 mengalami puncak pertumbuhan tertinggi pada jam ke-6. Fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang cepat. Madigan *et al.* (2009) mengatakan bahwa fase logaritmik

merupakan fase pertumbuhan bakteri yang berlangsung sangat cepat karena terjadi penggandaan sel bakteri secara cepat. Pada perhitungan pertumbuhan sel bakteri dengan metode TPC jumlah koloni terbesar terjadi pada jam ke-6 yaitu  $1.39 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K6) dan  $1.52 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K20). Pada perhitungan pertumbuhan sel bakteri dengan metode spektrofotometri, hasil pengukuran nilai absorbansi dikonversikan menjadi jumlah sel yang tersuspensi menggunakan rumus regresi linear yang didapat dari data standar McFarland, sampai didapatkan data kepadatan sel bakteri pada setiap pengukuran. Hasil perhitungan pertumbuhan sel bakteri dengan metode spektrofotometri terbesar terjadi pada jam ke 6, yaitu sebesar  $10.36 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K6) dan  $10.97 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K20) (Gambar 3 dan Gambar 4).



Gambar 2. Pertumbuhan isolat bakteri yang dihitung melalui metode TPC

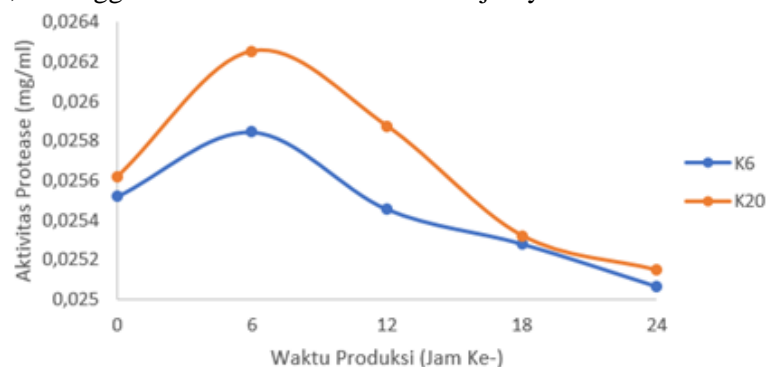


Gambar 3. Pertumbuhan isolat bakteri yang dihitung melalui metode spektrofotometri

#### Waktu Optimum Produksi Enzim Protease

Hasil pengukuran waktu optimum produksi enzim dari isolat bakteri dirata-ratakan berdasarkan 3 (tiga) ulangan yang dapat dilihat pada Gambar 4, dengan satuan mg/ml. Waktu optimum produksi enzim protease terjadi pada jam ke-6. Kerapatan optik menurun setelah jam ke-6. Pada waktu jam ke-12 sampai dengan jam ke-24, produksi enzim menurun karena berkurangnya jumlah substrat yang dipecah. Produk enzim yang terbentuk dan produk lainnya berupa asam dapat menghambat pembentukan kompleks enzim substrat. Akibat gangguan tersebut bisa terjadi perubahan struktur, sehingga sisi aktif enzim

mengalami perubahan dan tidak dapat digunakan dalam mengikat substrat secara baik (Yunita, 2012). Dugaan lain yakni kebutuhan nutrisi asam amino oleh bakteri sudah terpenuhi, atau bakteri mulai mengalami lisis atau mati (Yunita *et al.*, 2015). Aktivitas protease tertinggi dari isolat bakteri K6 sebesar 0,0258 mg/ml dan isolat bakteri K20 sebesar 0,0262 mg/ml. Hasil ini lebih besar jika dibandingkan dengan penelitian Inten *et al.*, (2015) yang melaporkan ekstrak tanah mangrove memiliki aktivitas protease mencapai  $1,9 \times 10^{-4}$  mg/ml. Waktu optimum produksi enzim protease akan digunakan untuk tahap selanjutnya.

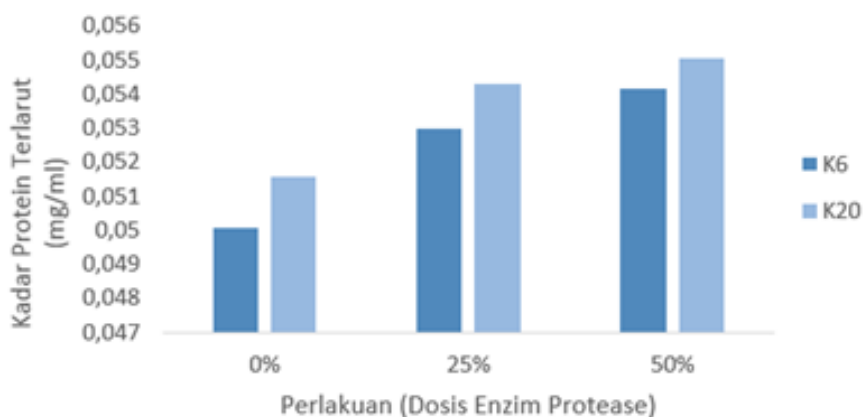


Gambar 4. Aktivitas protease isolat bakteri

### Uji Kemampuan Bakteri Proteolitik dalam Mendegradasi Serasah Mangrove

Kadar protein terlarut merupakan produk antara pada hidrolisis protein ekstrak enzim protease yang terkandung dalam ekstrak kasar substrat. Hasil pengukuran kadar protein terlarut pada bakteri K6 (*B. manliponensis*) dan bakteri K20 (*B. toyonensis*) dapat dilihat pada Gambar 5. Kadar protein terlarut secara nyata ( $P < 0.005$ ) dipengaruhi oleh enzim protease yang ditambahkan ke dalam substrat serasah mangrove. Kadar protein terlarut meningkat sejalan dengan meningkatnya dosis ekstrak kasar enzim protease yang ditambahkan. Kadar protein terlarut tertinggi pada bakteri K6 (*B. manliponensis*) dan bakteri K20 (*B. toyonensis*) yaitu pada perlakuan pemberian dosis ekstrak

kasar enzim protease sebesar 50% yaitu sebesar 0.054 mg/ml (bakteri K6) dan 0.055 mg/ml (bakteri K20). Namun demikian, nilai ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan pemberian dosis yang lain. Kadar protein terlarut terendah pada pemberian 0% yaitu sebesar 0.050 mg/ml (bakteri K6) dan 0.051 mg/ml (bakteri K20) dan menunjukkan perbedaan nyata dengan perlakuan yang mendapat penambahan dosis ekstrak kasar enzim protease. Murray *et al.* (2003) mengemukakan bahwa konsentrasi enzim berpengaruh terhadap reaksi inisiasi antara enzim dengan substrat yang akan menentukan kecepatan awal reaksi hidrolisis. Semakin terurai struktur protein maka semakin banyak persentase protein terlarutnya (Witono *et al.*, 2020).



Gambar 5. Kadar protein terlarut pada dosis enzim yang berbeda

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan kesimpulan sebagai berikut: (1) Puncak waktu optimum untuk pertumbuhan sel bakteri terjadi pada jam ke-6, yaitu perhitungan dengan metode TPC sebesar  $1.39 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K6) dan  $1.52 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K20) serta perhitungan dengan metode spektrofotometri sebesar  $10.36 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K6) dan  $10.97 \times 10^8$  CFU's/ml (bakteri K20); (2) Puncak waktu optimum untuk produksi enzim protease terjadi pada jam ke-6, yaitu sebesar 0.0258 mg/ml (bakteri K6) dan 0.0262 mg/ml (bakteri K20); (3) Bakteri K20 memiliki

pertumbuhan sel bakteri dan produksi enzim protease yang lebih baik jika dibandingkan dengan pertumbuhan sel bakteri dan produksi enzim protease dari bakteri K6; (4) Enzim protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri proteolitik mampu mendegradasi substrat serasah mangrove.

Adapun saran dari penelitian ini adalah perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut faktor yang mempengaruhi pertumbuhan maupun produksi enzim (pH, suhu dan lain lain) dan pengujian aktivitas protease secara kuantitatif untuk melihat lebih jelas seberapa besar aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri uji.

#### DAFTAR PUSTAKA

- DALYNN, Biological. (2014). *McFarland Standard*. Canada: DALYNN Biological.  
Effendi, I. (2020). *Metode Isolasi dan Identifikasi Bakteri*. Oceanum Press. Pekanbaru.

- Imron, M.F. dan I.F. Purwanti. (2016). Uji Kemampuan Bakteri *Azotobacter* S8 dan *Bacillus subtilis* untuk Menyisihkan *Trivalent Chromium* ( $\text{Cr}_3^+$ ) pada Limbah Cair. *Jurnal Teknik ITS* 5(1):F4–F10
- Madigan, M.T., J.M. Martinko. dan J. Parker. (2009). *Biology of Microorganism*. 9<sup>th</sup> Edition. Prentice Hall International, Inc. New Jersey.
- Murray, R.K., D.K. Granner, A.P. Mayes, and V.W. Rodwell. (2003). *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Ed 25, Jakarta.
- Naibaho, R. F., Yunasfi, dan A. Suryanti. (2015). Laju Dekomposisi Serasah Daun *Avicennia marina* dan Kontribusinya terhadap Nutrisi di Perairan Pantai Serambi Deli Kecamatan Pantai Labu. *Jurnal Aquacoastmarine* 7(2): 152-164.
- Olii, A.H., Muhlis, dan Sayuti. (2015). Ekosistem Mangrove Perairan Teluk Kwandang Kabupaten Gorontalo Utara. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 20(2); 49-55
- Syarial., W. Syahrian, dan T. Heriyanto. (2018). Inventarisasi dan Pola Penyebaran Regenerasi Alami Semai Mangrove Sejati di Utara Indonesia. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 23(1): 39-46
- Tyas, D.E., N. Widyorini dan A. Solichin. (2018). Perbedaan Jumlah Bakteri dalam Sedimen pada Kawasan Bermangrove dan Tidak Bermangrove di Perairan Desa Bedono, Demak. *Journal of Maquares*, 7(2):189-196.
- Widhyastuti, N. dan R.M. Dewi. (2001). Isolasi Bakteri Proteolitik dan Optimasi Produksi Protease. Laporan Teknik Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya Hayati. Pusat Penelitian Biologi. LIPI
- Witono, Y., M. Maryanto, I. Taruna, A.D. Masahid, dan K. Cahyaningti. (2020). Aktivitas Antioksidan Hidrolisat Protein Ikan Wader (*Rasbora jacobsoni*) dari Hidrolisis oleh Enzim Calotropin dan Papain. *Jurnal Agroteknologi* 14(1):1-8
- Yunita, R., T.T., Nugroho, dan F. Puspita. (2015). Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *JOMP FMIPA*, 1:116-122.
- Yunita, S.P. (2012). Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Zebua, A.B.P., Nursyirwani, dan Feliatra. (2020). Molecular Identification of Proteolytic Bacteria from Mangrove Sediment in Dumai Marine Station. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 3(2): 179-188