



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI
PENGHASIL ENZIM PROTEASE PADA TEMPE
GEMBUS PASCA FERMENTASI 1 HARI
BERDASARKAN ANALISIS
GEN 16S rRNA



Wa Ode Inayatul
G1C217077

PROGRAM STUDI D IV ANALIS KESEHATAN
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG
2018

HALAMAN PERSETUJUAN

Manuscript dengan judul

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI
PENGHASIL ENZIM PROTEASE PADA TEMPE
GEMBUS PASCA FERMENTASI 1 HARI
BERDASARKAN ANALISIS
GEN 16S rRNA

Telah diperiksa dan disetujui untuk mempublikasikan

Semarang, September 2018

Pembimbing I


Dr. Stalis Norma Ethica, M.SI
NIK. CP.1026.040

Pembimbing II


Dr. Ana Hidayati Mukaromah, M.SI
NIK. 28.6.1026.038

SURAT PERNYATAAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Yang bertandatangan di bawah ini, saya :

Nama : Wa Ode Inayatul
NIM : G1C217077
Fakultas/Jurusan : Ilmu Keperawatan Dan Kesehatan Universitas
Muhammadiyah Semarang / Jusus D-IV Analis Kesehatan
Judul : Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil
Enzim Protease pada Tempe Gembus pasca Fermentasi 1
Hari Berdasarkan Analisis Gen 16S rRNA
Gmail : wdinayatul@gmail.com

Dengan ini menyatakan bahwa saya menyetujui untuk :

1. Memberikan hak bebas royalti kepada Perpustakaan Unimus atas penulisan karya ilmiah saya, demi pengembangan ilmu pengetahuan
2. Memberikan hak penyimpanan, mengalih mediakan/mengalih formatkan, mengelola dalam bentuk pangakalan data (*database*), mendistribusikannya, kepada Perpustakaan Unimus, tanpa perlu meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta
3. Bersedia dan menjamin untuk menanggung secara pribadi tanpa melibatkan pihak Perpustakaan Unimus, dari semua bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran hak cipta dalam karya ilmiah ini.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan semoga dapat digunakan sebagai mana mestinya.

Semarang, 21 September 2018
Yang Menyatakan


(Wa Ode Inayatul)

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE PADA TEMPE GEMBUS PASCA FERMENTASI 1 HARI BERDASARKAN ANALISIS GEN 16S rRNA

Wa Ode Inayatul¹, Ana Hidayati Mukaromah², Akbar Firmansyah³, Sri Darmawati¹,
Stalis Norma Ethica²

¹The Courses Of The Faculty Of Health Science Analyst DIV Nursing and Health University Of Muhammadiyah Semarang

²The Courses Of The Faculty Of Health Science Analyst DIII Of Nursing and Health University Of Semarang Muhammadiyah

³Tropical Marine Biotechnology Laboratory of the Faculty of Fisheries and Marine Sciences University of Diponegoro

Info Artikel

Abstrak

Protease is a group of enzymes that play an important role in biochemical reactions, which use protein break down. Protease is among main enzymes used in industry, which commercial value reach 60% of total enzymes world wide. This study aimed to isolate protease-producing bacterium found on tempe gembus in after 1-day post-fermentation and to identify the bacterial isolat obtained based on the analysis of its 16S rRNA gene. Isolation and purification process was done using Nutrient Agar media with spread technique. The protease production test was carried out on skim milk agar medium. The molecular identification process was performed by analyzing sequence of 16S rRNA gene fragment of bacteria amplified using both forward primer F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') and reverse primer R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The amplified DNA from PCR was then sequenced. From the isolation process a bacterial strain that has a proteolytic activity

***Corresponding Author:**

Wa Ode Inayatul

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: wdinayatul@gmail.com

<http://repository.unimus.ac.id>

based on observation of clear zone area with a diameter of 85 mm was obtained. From sequence alignment result using BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) the fragment of 16S rRNA gene of strain ISTD1.4 obtained has similarity level of 98% with

fragment of 16S ribosomal RNA gene of bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain E141. In conclusion, strain ISTD1.4 is a potential protease-producing bacteria and is identified as *Pseudomonas stutzeri* ISTD4.

keywords:

Bacterial isolation, molecular identification, proteolytic bacteria, 16S rRNA gene



Pendahuluan

Enzim protease diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Peran protease dalam tubuh antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah, dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim, hormon, serta neurotransmiter (Baehaki dan Rinto, 2011).

Protease adalah enzim yang berperan penting dalam reaksi biokatalis yang menyebabkan pemecahan protein. Protease merupakan salah satu enzim dalam bidang industri yang nilai komersialnya mencapai 60% dari total penjualan enzim seluruh dunia. Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan maupun mikroorganisme seperti bakteri (Fatoni dkk., 2008).

Media *Skim Milk Agar* (SMA) merupakan media yang mengandung kasein. Kasein merupakan protein utama susu, suatu makromolekul yang tersusun atas sub unit asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptide. Kasein tersebut berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease (Fatoni dkk., 2008).

Tempe gembus merupakan pangan fermentasi asli dari Indonesia. Tempe gembus dibuat dari bahan dasar ampas tahu melalui proses fermentasi oleh mikroorganisme yang sama yang digunakan pada pembuatan tempe kedelai, yaitu *Rhizopus* sp. Komposisi zat gizi tempe gembus mirip dengan tempe kedelai meskipun kadarnya lebih kecil (Sulchan dan Endang 2007).

Karena tempe gembus merupakan produk fermentasi yang mengandung protein, maka sangat dimungkinkan bakteri yang terdapat pada tempe gembus merupakan penghasil protease. Protease disekresi oleh bakteri untuk mencerna.

Enzim protease bernilai komersial, sehingga perlu ditemukan sumber-sumber penghasil enzim protease, salah satunya bakteri yang terdapat pada tempe gembus.

Polymerase Chain Reaction (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk melipat gandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Analisis gen 16S rRNA adalah salah satu analisis gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme (Darmawati dkk., 2012; 2014; 2015).

Bahan dan Metode

Objek penelitian ini adalah bakteri penghasil enzim protease yang terdapat pada tempe gembus pasca fermentasi 1 hari. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Tropis Marine Biotechnology Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, mikropipet, *incubator*, *hot plate*, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung, tabung konikal, erlenmeyer, gelas ukur, spiritus, ose, vortex (Thermo Mixer TM205), *mikrotube*, sentrifugator, *waterbath*, microwave, cetakan gel agarosa, sisir, alat elektroforesis, *powersupply*, UV transiluminator, *thermocycler* (mesin PCR), elektroforesis *chamber*. Peralatan lain yang digunakan antara lain aluminium foil, lemari pendingin, alat tulis, dan kamera digital.

Media *BrainHeart Infusion Broth* (BHI, Oxoid), media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA, Oxoid), *Nutrient Agar Plate* (NAP, Oxoid), gentian violet, Gram iodine, alkohol asam, safranin 1%, *Skim Milk Agar* (MSA) (Sigma Aldrich,

*Corresponding Author:

Wa Ode Inayatul

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: wdinayatul@gmail.com

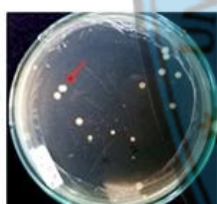
<http://repository.unimus.ac.id>

USA), NaCl fisiologis, *aquadest* steril, *buffer lysis*, Chelex 100 Rein (Biorad), etanol 75% ddH₂O, Primer 27 F dan 1492 R, *PhospatBufferSaline* (PBS), Marker 1500 bp, dan gel agarosa 1%.

Hasil

Isolasi dan Purifikasi Bakteri

Isolasi merupakan proses pemindahan organism dari habitat asli ke dalam habitat baru untuk dikembangkan. Purifikasi merupakan pemurnian atau memisahkan koloni bakteri yang murni. Dari hasil pemurnian di dapatkan 11 koloni bakteri yang murni dengan kode isolat ISTD_{1.1}, ISTD_{1.2}, ISTD_{1.3}, ISTD_{1.4}, ISTD_{1.5}, ISTD_{1.6}, ISTD_{1.7}, ISTD_{1.8}, ISTD_{1.9}, ISTD_{1.10}, ISTD_{1.11}. Dari ke 11 koloni dipilih satu koloni bakteri dengan kode isolat ISTD_{1.4} dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Isolasi Koloni bakteri ISTD_{1.4}

Pewarnaan Gram Isolat Bakteri

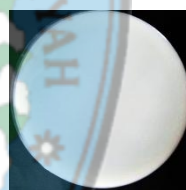
Hasil pewarnaan Gram dari 11 isolat bakteri, isolat bakteri dengan kode ISTD_{1.1}, ISTD_{1.2}, ISTD_{1.3}, ISTD_{1.8} termasuk kokus Gram-Positif, ISTD_{1.4}, ISTD_{1.7}, ISTD_{1.10} termasuk bakteri basil Gram-Negatif, dan kode isolat ISTD_{1.8}, ISTD_{1.9}, ISTD_{1.11} merupakan kokus Gram-Positif. Dari ke 11 koloni di atas dipilih salah satu bentuk koloni yang unik untuk dilanjutkan ke tahap molekuler dengan kode ISTD_{1.4}

Tabel 1. Pewarnaan Gram Isolat Bakteri

No	Kode Sampel	Karakteristik Koloni Bakteri
1	ISTD _{1.1}	Kokus Gram-positif
2	ISTD _{1.2}	Kokus Gram-positif
3	ISTD _{1.3}	Kokus Gram-positif
4	ISTD _{1.4}	Basil Gram-negatif
5	ISTD _{1.5}	Basil Gram-positif
6	ISTD _{1.6}	Kokus Gram-positif
7	ISTD _{1.7}	Basil Gram-negatif
8	ISTD _{1.8}	Kokus Gram-positif
9	ISTD _{1.9}	Basil Gram-positif
10	ISTD _{1.10}	Basil Gram-negatif
11	ISTD _{1.11}	Basil Gram-positif

Uji Bakteri Penghasil Enzim Protease

Dalam pengujian penghasil enzim protease, hasil yang diperoleh yaitu adanya zona bening disekitar media dengan diameter 85,00 mm yang menandakan adanya bakteri protease yang dapat menghidrolisis protein.



(a)



(b)

Gambar 2. Hasil uji penghasilan enzim protease (a) isolate bakteri pada medium SMA awal (b) Pembacaan zona bening protease yang dihasilkan bakteri pada medium SMA.

Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Genom Bakteri

Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA Genom dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi DNA genom Bakteri

No	Kode Sampel	260/280	Unit
1	Blangko	1.53	ng/μl
2	ISTD _{1.4}	2.06	ng/μl

*Corresponding Author:

Wa Ode Inayatul

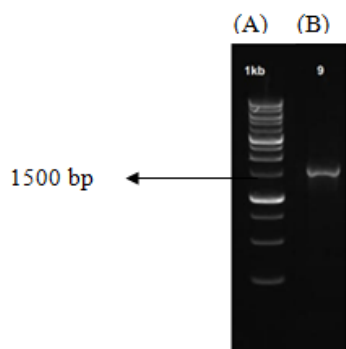
Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas I Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: wadinayatul@gmail.com

<http://repository.unimus.ac.id>

Hasil uji kuantitas dan kualitas DNA yang diperoleh pada penelitian ini didapatkan hasil pengukuran konsentrasi DNA OD 260/280 2.06 ng/μl dan terdapat pita DNA genom.

Amplifikasi Fragmen Gen 16S rRNA metode PCR



Gambar 2. Elektroforesis PCR DNA (A) Marker (B) DNA Sampel

Berdasarkan hasil elektroforesi PCR didapatkan satu untai ganda DNA yang sejajar dengan marker ± 1500 bp sejajar dengan produk amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri ISTD_{1.4}. Dengan demikian dapat dikatakan gen 16S rRNA bakteri dapat di amplifikasi.

Sekuensing DNA Pengkode Gen 16S rRNA

Produk amplifikasi isolat bakteri yang berhasil selanjutnya dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia yang kemudian akan dikirim 1st BASE sequencing INT di Malaysia untuk pemetaan pasang basa. Hasil yang diperoleh selanjutnya dianalisis pada Gen Bank menggunakan BLAST. Urutan basa nitrogen yang diperoleh mempunyai kemiripan 98% dengan fragmen gen 16S ribosomal RNA isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri* strain E141 (Genbank kode akses: MG725953. 1).

Diskusi

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bakteri penghasil enzim protease pada tempe gembus pasca fermentasi 1 hari dengan analisis gen 16S rRNA. Penelitian ini dimulai dengan sterilisasi alat dan bahan. Sterilisasi dilakukan dengan 2 cara, yaitu sterilisasi uap dengan menggunakan autoklaf dan sterilisasi kering dengan menggunakan oven. Sterilisasi dengan autoklaf dilakukan dengan menyimpan alat atau medium yang akan digunakan di dalam autoklaf, lalu autoklaf dinyalakan hingga mencapai temperatur 121°C, lalu dibiarkan selama 15 menit pada temperatur tersebut untuk membunuh mikroorganisme kontaminan yang kemungkinan didapat mengkontaminasi alat ataupun medium.

Kemudian dilanjutkan dengan preparasi dan pengenceran suspensi sampel 10^{-1} - 10^{-10} . Suspensi hasil pengenceran yang dipilih untuk ditanam pada media NA hanya sampel pada tabung tanpa pengenceran dan pengenceran 10^{-6} - 10^{-10} . Setelah pengamatan morfologi koloni, dilanjutkan dengan pewarnaan Gram yang dibaca pada mikroskop cahaya untuk melihat jenis bakteri gram positif atau gram negatif. Pada penelitian ini isolat ISTD1.4 merupakan bakteri basil Gram-negatif.

Pada penelitian ini dilakukan purifikasi koloni bakteri pada sampel ISTD1.4. purifikasi ini bertujuan untuk mendapatkan koloni murni bakteri yang tidak bercampur dengan koloni bakteri lain. Purifikasi ini dilakukan sebanyak tiga kali hingga diperoleh koloni bakteri murni yang mengandung sel-sel bakteri dengan bentuk yang seragam.

Bakteri berbentuk batang Gram-negatif yang diperoleh kemudian diuji kemampuannya dalam menghasilkan

*Corresponding Author:

Wa Ode Inayatul

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: wdinayatul@gmail.com

<http://repository.unimus.ac.id>

proteasenya menggunakan media seleksi agar susu skim. Pada penelitian ini, isolat ISTD1.4 mampu menghasilkan protease yang ditandai dengan adanya zona bening sebesar 85,00 mm. Jika bakteri menghasilkan zona bening lebih dari 12,00 mm berarti bakteri tersebut mempunyai kemampuan menghasilkan enzim protease yang relatif cukup besar.

Untuk mengetahui konsentrasi DNA genom bakteri penghasil protease isolat ISTD1.4 hasil ekstraksi maka dilakukan uji kualitas dan kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer. Pada penelitian ini diperoleh konsentrasi DNA genom yaitu 2.06 ng/μL. Dari hasil ini diketahui bahwa konsentrasi DNA melebihi batas standar yaitu 1,8-2,0 nm/μL. Hal ini kemungkinan besar disebabkan adanya kontaminasi etanol.

DNA genomik yang telah diisolasi dan diekstraksi dari isolat kemudian digunakan sebagai templat atau cetakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR menggunakan primer universal untuk gen 16S rRNA primer 27F:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' dan primer 1492R 5'-GGTTACSTTGTTCGACTT-3'. Proses amplifikasi ini diharapkan dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA yang biasanya berukuran sepanjang 1500 bp (Ethicadkk., 2013, 2018). Hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarosa dan divisualisasi dengan sinar UV. Untuk melihat spesies bakteri, maka hasil amplifikasi dilakukan proses sekuensing (Rinanda, 2011; Ethica dkk., 2014, 2017).

Hasil proses sekuensing yang dilakukan oleh pihak ketiga yaitu 1st BASE Malaysia adalah berupa urutan nukleotida gen 16S rRNA. Analisis BLAST dilakukan terhadap urutan nukleotida gen 16S rRNA secara online

melalui <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasil BLAST menunjukkan tingkat kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat yang diperoleh dengan urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang telah terdaftar di GenBank. Dari hasil pensejajaran, diketahui fragmen gen 16S rRNA strain ISTD1.4 yang diperoleh memiliki tingkat kemiripan 98% dengan fragmen gen 16S *ribosomal* RNA isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri* strain E141 (Genbank kode akses: MG725953. 1). Dengan demikian strain ISTD1.4 dapat dinyatakan sebagai bakteri *Pseudomonas stutzeri* ISTD-1 (ISTD = *Indonesian Soybean Tempeh Day-1*).

Berdasarkan kajian pustaka, bakteri *Pseudomonas stutzeri* adalah bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, dan memiliki flagel kutub tunggal. Bakteri ini berukuran 1-3 μm, berdiameter 0,5 μm. Bakteri ini banyak ditemukan di tanah dan tumbuh pada berbagai macam karbohidrat termasuk pati, pektin, dan maltosa dan juga mengandung enzim amylase. *Pseudomonas stutzeri* disebut juga sebagai *dinitrifiers* karena bakteri ini mampu merubah nitrat menjadi gas nitrogen. *Pseudomonas stutzeri* tidak bersifat patogen pada manusia.

Berdasarkan hasil penelitian dan data literatur yang diperoleh, dapat dikatakan bahwa strain ISTD-1 merupakan strain bakteri yang potensial sebagai sumber protease. Karena merupakan spesies bakteri *Pseudomonas stutzeri* yang tergolong nonpatogen, maka pemanfaatan strain ISTD-4 sebagai penghasil protease untuk skala yang lebih besar menarik.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan pada sampel tempe gembus pasca fermentasi 1 hari, didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

*Corresponding Author:

Wa Ode Inayatul

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: wdinayatul@gmail.com

<http://repository.unimus.ac.id>

1. Berdasarkan hasil isolasi dan purifikasi diperoleh 11 isolat koloni dengan bentuk yang berbeda-beda dan dari 11 koloni dipilih satu koloni bakteri yang unik dengan aktivitas proteolitik yang ditunjukkan adanya zona bening pada media *Skim Mlik Agar* dengan diameter 85,00 mm.
2. Berdasarkan hasil analisis molekuler berbasis sekuen gen 16S rRNA, isolate ISTD4 teridentifikasi sebagai *Pseudomonas stutzeri* strain E141 (Genbank kode akses: MG725953. 1). Dengan demikian strain ISTD1.4 dapat dinyatakan sebagai bakteri *Pseudomonas stutzeri* ISTD-1 (ISTD = Indonesian Soybean Tempeh Day-1).

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah ditemukan, maka penulis menyarankan kepada peneliti berikutnya untuk melakukan penelitian yang sama tetapi menggunakan sampel fermentasi yang berbeda.

Ucapan Terima Kasih

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas anugerah-Nya sehingga artikel ini dapat diselesaikan. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Stalis Norma Ethica, M.Si dan Dr. Ana Hidayanti Mukaromah, M.Si selaku pembimbing pertama dan pembimbing kedua yang telah banyak memberikan waktu, ilmu dan bimbingan selama penyusunan proposal, pengerjaan penelitian, penulisan skripsi, hingga menyusun artikel ini.

Daftar Pustaka

- Baehaki, A dan Rinto. 2011. Karakteristik Protease dari Isolat Bakteri Asal Tumbuhan Rawa dari Indralaya. Jurnal. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya. Palembang.
- Ethica, S.N., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, I., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Comparative Evaluation of Conventional Versus Rapid Methods for Amplifiable Genomic DNA Isolation of Cultured *Azospirillum* sp. JG3. *Indonesian Journal of Chemistry*, 13(3), pp.28-253.
- Ethica, S.N., Hammi, M.K., Lestari, P., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Amplification of *Azospirillum* sp. JG3 glpD gene fragment using degenerate primers generated by web-based tools. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(3), p.231.
- Ethica, S.N., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, I., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Comparative evaluation of conventional versus rapid methods for amplifiable genomic DNA isolation of cultured *Azospirillum* sp. JG3. *Indonesian Journal of Chemistry*, 13(3), pp.248-253.
- Ethica, S.N. and Raharjo, T.J., 2014. *Detection of genes involved in glycerol metabolism of Alcaligenes* sp. JG3 (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada).

*Corresponding Author:

Wa Ode Inayatul

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: wdinayatul@gmail.com

<http://repository.unimus.ac.id>

- Ethica, S.N., Oedjijono, O., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2018. Genotypic and Phenotypic Characterization Of *Alcaligenes javaensis* Jg3 Potential AS An Effective Biodegrader. *Biotropia-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, 25(1), pp.1-10.
- Ethica, S.N., Semiarti, E., Widada, J., Oedjijono, O. and Joko Raharjo, T., 2017. Characterization of moaC and a non target gene fragments of food-borne pathogen *Alcaligenes* sp. JG3 using degenerate colony and arbitrary PCRs. *Journal of Food Safety*, 37(4), p.e12345.2.
- Fatoni, A. Z. dan Puji, L. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Air Tahu. *Jurnal Natur Indonesia*.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W., Artama, W.T. and Kawaichi, M., 2014. Phylogenetic relationship of Gram Negative Bacteria of Enterobacteriaceae Family in the Positive Widal Blood Cultures based on 16S rRNA Gene Sequences. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19(1), pp.64-70.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W. and Artama, W.T., 2015. Identifikasi bakteri batang Gram-negatif pada darah widal positif berdasarkan karakter fenotipik.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W. and Artama, W.T., 2012. Keanekaragaman Spesies Bakteri pada Kultur Darah Widal Positif Asal Kota Semarang Berdasarkan Karakter Fenotipik. In *Prosiding Seminar Biologi* (Vol. 9, No. 1).
- Sulchan M, Endang NW. 2007. Nilai gizi dan komposisi asam amino tempe. *MajKedoktIndon*.
- Dewi, R.S. & Aziz, S., 2011. Isolasi *Rhizopusoligosporus* pada beberapa inokulum tempe di Kabupaten Banyumas. *Molekul*.

***Corresponding Author:**

Wa Ode Inayatul

Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail: wdinayatul@gmail.com

<http://repository.unimus.ac.id>

