

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar belakang

Resistensi antimikroba telah menjadi salah satu tantangan kesehatan global yang paling mengancam dalam era modern. Berdasarkan data World Health Organization (WHO) pada tahun 2024, infeksi yang disebabkan oleh bakteri resisten antibiotik menyebabkan sekitar 700.000 kematian per tahun di seluruh dunia (Sati et al., 2025). Angka ini akan meningkat secara drastis hingga mencapai 10 juta kematian per tahun pada tahun 2050 jika tidak ada solusi yang efektif (O'Neill, 2016). Permasalahan ini tidak hanya berdampak pada aspek kesehatan, tetapi juga mengancam stabilitas ekonomi global dengan potensi kerugian mencapai 100 triliun dolar AS. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan salah satu patogen yang paling mengkhawatirkan dalam krisis resistensi antimikroba, dengan tingkat mortalitas yang mencapai 20-40% pada kasus bakteremia, jauh lebih tinggi dibandingkan infeksi *Staphylococcus aureus* yang masih sensitif terhadap antibiotik konvensional (Hasanpour et al., 2023; Hassoun et al., 2017).

MRSA merupakan bakteri Gram positif yang menunjukkan resistensi terhadap hampir semua antibiotik β -laktam (Abebe & Birhanu 2023), termasuk metisilin, penisilin, ampisilin, makrolida, aminoglikosida, fluorokuinolon, vankomisin, teicoplanin, dan sebagian besar sefalosporin generasi pertama hingga ketiga (Jubeh et al., 2020; Maddiboyina et al., 2023). Kemampuan MRSA untuk membentuk biofilm yang resisten, mentransfer gen resistensi melalui plasmid, dan mengembangkan mekanisme pertahanan yang kompleks telah menjadikannya sebagai patogen nosokomial utama yang sulit dimusnahkan dari lingkungan rumah sakit maupun komunitas (Brdová et al., 2024; Kaushik et al., 2024; Uddin et al., 2021). Keterbatasan efektivitas antibiotik konvensional dalam mengatasi infeksi MRSA telah mendorong kebutuhan mendesak untuk mengembangkan strategi terapi alternatif yang inovatif dan berkelanjutan.

Saat ini, sebagian besar penelitian masih berfokus pada modifikasi struktur antibiotik konvensional atau penggunaan kombinasi antibiotik untuk meningkatkan efektivitas terhadap MRSA. Namun, pendekatan ini memiliki keterbatasan dari aspek waktu pengembangan yang lama, biaya yang tinggi, dan potensi munculnya resistensi baru yang lebih cepat. Selain itu, mayoritas antibiotik yang tersedia saat ini berasal dari sumber terestrial yang telah dieksplorasi secara intensif, sehingga penemuan kandidat antibiotik baru dari sumber ini semakin terbatas. Oleh karena itu, eksplorasi sumber daya alam yang belum tergali secara optimal, khususnya dari lingkungan laut, menjadi strategi yang menjanjikan dan sangat penting untuk dikaji lebih lanjut dalam pengembangan agen antimikroba baru yang efektif terhadap MRSA.

Lingkungan laut yang meliputi 70% permukaan bumi memiliki keragaman filogenetik yang jauh lebih besar dibandingkan lingkungan terestrial (Cantonati et al., 2020; Srinivasan et al., 2021). Berbagai jenis bakteri laut telah berevolusi untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan ekstrem, seperti intensitas cahaya rendah, tekanan tinggi, pH asam, suhu rendah, serta variasi kandungan oksigen dan salinitas

(Martínez et al., 2022). Adaptasi terhadap kondisi ekstrem ini mendorong bakteri laut dalam menghasilkan metabolit primer dan sekunder dengan struktur kimia unik serta bioaktivitas yang kompleks sebagai mekanisme pertahanan terhadap predator (Perera et al., 2025) dan strategi kompetisi untuk memperoleh nutrisi (Barzkar et al., 2023). Kondisi lingkungan laut yang ekstrem tersebut telah memaksa mikroorganisme laut untuk menghasilkan enzim dan senyawa bioaktif dengan stabilitas dan aktivitas yang superior dibandingkan dengan mikroorganisme terrestrial (Alves & Kijjoa 2020; Dalmaso et al., 2015).

Ekosistem laut Indonesia mencakup berbagai habitat unik seperti terumbu karang, laut dalam, zona hidrothermal, dan sedimen laut yang menjadi rumah bagi jutaan mikroorganisme dengan potensi bioaktif yang tinggi (Corinaldesi, 2015). Senyawa bioaktif yang diproduksi oleh mikroorganisme laut, khususnya bakteri, menarik perhatian peneliti karena keragaman struktural dan potensi farmakologisnya yang tinggi (Alves & Kijjoa 2020; Barzkar et al., 2023). Meskipun potensi biodiversitas laut Indonesia sangat besar, pemanfaatannya untuk pengembangan agen antimikroba, khususnya yang efektif terhadap MRSA, masih sangat terbatas dan belum optimal, termasuk enzim.

Enzim yang dihasilkan oleh bakteri laut memiliki banyak aplikasi dalam bioindustri (Rao et al., 2017), termasuk amilase, lipase, protease, gelatinase, selulase, dan kitinase (Beygmoradi & Homaei 2017). Enzim-enzim ini stabil secara termal, tahan terhadap berbagai nilai pH dan kondisi ekstrim lainnya yang diperlukan untuk aplikasi industri dan memiliki aplikasi biologis yang terkait dengan kesehatan manusia (Ashaolu et al., 2025). Protease, sebagai salah satu kelompok enzim terbesar yang dihasilkan oleh bakteri laut, menunjukkan potensi yang sangat menjanjikan sebagai agen antimikroba terbaru (Solanki et al., 2021). Enzim proteolitik ini memiliki kemampuan untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein target secara spesifik, yang dapat dimanfaatkan untuk mendegradasi komponen protein esensial pada patogen bakteri (Culp & Wright 2017). Keunggulan protease sebagai agen antimikroba terletak pada mekanisme kerjanya yang berbeda dengan antibiotik konvensional, di mana protease dapat menyerang beberapa protein target secara bersamaan, seperti protein dinding sel, protein matriks biofilm, dan protein virulensi bakteri, sehingga mengurangi kemungkinan terbentuknya resistensi (Balenahalli et al., 2024).

Beberapa penelitian telah menunjukkan potensi protease dari bakteri laut sebagai agen antimikroba. Rachanamol et al., (2017) mengisolasi protease *Bacillus subtilis* VCDA dari pantai barat daya India pada kedalaman berkisar 6–7 meter yang memiliki kemampuan menghambat *S. aureus*. Kabeer et al., (2018) mengisolasi bakteri laut dari sedimen lereng benua di Laut Arab menghasilkan protease antara lain dari filum Firmicutes dan Proteobacteria, dan tergolong dalam genus *Bacillus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Chryseomicrobium*, *Exiguobacterium*, dan *Halomonas*. Anteneh et al., (2021) mengisolasi *Streptomyces* sp. yang berasosiasi dengan spons laut Australia Selatan yang menghasilkan protease dengan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri patogen *S. aureus* dan termasuk strain yang resisten terhadap metisilin. Al Aboghaubar et al., (2025) berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi protease strain MB3 dan MB8 yang berasosiasi dengan spons laut yang dikumpulkan dari wilayah

NEOM, Arab Saudi dan menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Candida albicans*.

Meskipun penelitian-penelitian tersebut menunjukkan hasil yang menjanjikan, terdapat beberapa keterbatasan yang perlu diatasi. Pertama, sebagian besar penelitian masih terbatas pada skrining aktivitas antimikroba tanpa analisis mekanisme kerja yang mendalam, khususnya terhadap MRSA. Kedua, fokus penelitian lebih banyak pada karakterisasi biokimia protease untuk aplikasi industri seperti pembuatan deterjen, tekstil, dan pengolahan makanan (Hamid et al., 2022; Solanki et al., 2021), karena protease bakteri laut memiliki stabilitas yang lebih baik terhadap kondisi lingkungan ekstrim seperti suhu tinggi, pH ekstrim, salinitas tinggi (Kochhar et al., 2022), spesifisitas substrat yang berbeda dan aktivitas katalitik lebih tinggi dibandingkan protease dari sumber lainnya (Razzaq et al., 2019). Ketiga, evaluasi sistematis terhadap MRSA dengan berbagai profil resistensi dan analisis mekanisme kerja yang komprehensif masih sangat jarang dilakukan. Keempat, meskipun beberapa protease menunjukkan aktivitas antimikroba yang tinggi secara *in vitro*, konfirmasi efektivitasnya pada sistem biologis yang kompleks belum dapat dipastikan tanpa evaluasi *in vivo* yang komprehensif.

Pendekatan konvensional yang hanya melakukan skrining aktivitas antimikroba melalui uji zona hambat, penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM), dan analisis mikroskopik memiliki keterbatasan dalam menjelaskan mekanisme kerja protease pada tingkat molekuler, khususnya dalam mengidentifikasi protein target spesifik pada MRSA. Keterbatasan ini disebabkan oleh kompleksitas analisis yang memerlukan kombinasi pendekatan komputasional dan eksperimental. Untuk memperoleh pemahaman yang komprehensif mengenai mekanisme kerja protease sebagai agen anti-MRSA, diperlukan pendekatan integratif yang menggabungkan analisis *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo*.

Pendekatan *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* memiliki beberapa keunggulan strategis. Pertama, studi *in silico* menggunakan teknik molekular docking dapat memprediksi interaksi antara protease dengan protein target pada MRSA (Santos et al., 2019). Perihal konteks ini, protein-protein esensial pada MRSA seperti protein pengikat penisilin (PBP2a), protein dinding sel, protein membran, dan faktor virulensi dapat menjadi target potensial yang perlu dianalisis. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran mekanisme degradasi protein target oleh protease pada tingkat molekuler dengan visualisasi interaksi yang detail. Selain itu, analisis *in silico* juga dapat mengidentifikasi residu asam amino yang berperan penting dalam aktivitas katalitik dan spesifisitas substrat protease (Barnsley & Ondrechen 2022; Romsuk et al., 2022).

Karakterisasi *in vitro* protease dari bakteri laut telah menunjukkan hasil yang beragam bergantung pada sumber isolat dan kondisi kultivasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa protease dengan aktivitas antimikroba yang tinggi dapat diperoleh melalui optimasi kondisi produksi dan pemurnian yang tepat (Saubenova et al., 2025; Xu et al., 2023). Namun, evaluasi sistematis terhadap spektrum aktivitas antimikroba protease, khususnya terhadap MRSA, masih sangat terbatas. Hal ini

mengindikasikan bahwa karakterisasi *in vitro* yang komprehensif sangat penting untuk memahami potensi protease sebagai agen anti-MRSA.

Evaluasi *in vivo* menggunakan model hewan uji merupakan tahapan penting dalam validasi efektivitas protease sebagai agen anti-MRSA (Martinez et al., 2025; Mukherjee et al., 2022). Meskipun beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas antimikroba protease secara *in vitro*, namun konfirmasi efektivitasnya pada sistem biologis yang kompleks masih sangat jarang dilakukan. Hal ini menjadi penting mengingat kondisi *in vivo* yang melibatkan sistem imun, distribusi obat, dan metabolisme enzim dapat mempengaruhi efektivitas protease.

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan, penelitian sebelumnya menggunakan pendekatan konvensional yang hanya berfokus pada satu aspek karakterisasi tidak menunjukkan hasil yang komprehensif dibandingkan dengan pendekatan integratif yang menggabungkan analisis *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo*. Hal ini mengindikasikan bahwa pendekatan integratif dapat menjadi pilihan yang tepat dalam mengeksplorasi potensi protease dari bakteri laut sebagai agen anti-MRSA. Oleh karena itu, penelitian ini dirancang untuk menjawab kebutuhan mendesak akan agen antimikroba alternatif terhadap MRSA melalui eksplorasi protease dari bakteri laut Indonesia, khususnya dari laut Sulawesi Selatan yang memiliki kondisi lingkungan ekstrem dan belum tergalikan secara optimal. Melalui pendekatan integratif yang menggabungkan analisis *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo*, studi ini tidak hanya menawarkan pemahaman mekanisme yang mendalam, tetapi juga membuka peluang pengembangan terapi enzimatik yang inovatif, berkelanjutan, dan mendukung kemandirian biofarmaka nasional.

1.2 Rumusan masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bakteri laut jenis apa yang dapat diisolasi dari Pantai Losari dengan aktivitas proteolitik tertinggi dan bagaimana karakteristiknya?
2. Bagaimana karakteristik sifat biokimiawi dan kemurnian protease dari bakteri laut terpilih?
3. Bagaimana mekanisme kerja protease dalam menghambat bakteri MRSA berdasarkan analisis *in silico*?
4. Berapa besar aktivitas anti-MRSA dari protease hasil purifikasi secara *in vitro*?
5. Bagaimana efektivitas protease sebagai agen anti-MRSA berdasarkan evaluasi *in vivo*?
6. Bagaimana mekanisme protease bakteri laut sebagai kandidat agen terapeutik alternatif untuk mengatasi infeksi MRSA?

1.3 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini dilakukan adalah:

1. Menganalisis karakteristik bakteri laut dari Pantai Losari yang dengan memiliki aktivitas proteolitik tertinggi.
2. Mengarakterisasi sifat biokimia dan memurnikan protease dari bakteri laut terpilih.
3. Menganalisis mekanisme kerja protease dari bakteri laut terhadap MRSA melalui pendekatan *in silico*.
4. Mengevaluasi aktivitas anti-MRSA protease dari bakteri laut secara *in vitro*.
5. Menguji efektivitas protease dari bakteri laut sebagai agen anti-MRSA secara *in vivo*.
6. Menganalisis mekanisme potensi protease bakteri laut sebagai kandidat agen terapeutik alternatif untuk mengatasi infeksi MRSA.

1.4 Batasan masalah

Eksplorasi protease dari bakteri laut Indonesia sebagai kandidat terapi anti-MRSA Adalah kajian multidisiplin yang mencakup mikrobiologi, biokimia, biologi molekuler, dan farmakologi. Luasnya cakupan penelitian dari pengambilan sampel, isolasi mikroorganisme, purifikasi enzim, hingga evaluasi bioaktivitas menuntut adanya batasan yang jelas agar penelitian tetap terarah dan mendalam. Oleh karena itu, penelitian ini difokuskan pada parameter-parameter kunci yang relevan dengan tujuan, mempertimbangkan aspek teknis, sumber daya, serta signifikansi ilmiah dalam pengembangan agen antimikroba baru. Berdasarkan pertimbangan tersebut, maka batasan masalah dalam penelitian ini ditetapkan sebagai berikut:

1. Sumber sampel: sedimen dan air laut dari Pantai Losari, Makassar, Sulawesi Selatan.
2. Isolasi bakteri: difokuskan pada bakteri laut penghasil protease ekstraseluler dengan zona proteolisis pada media skim milk agar.
3. Karakterisasi enzim: Meliputi berat molekul, pH dan suhu optimum, stabilitas, serta aktivitas spesifik protease.
4. Analisis *in silico*: terbatas pada molekular docking dan dinamika molekuler untuk memprediksi interaksi protease dengan protein target MRSA.
5. Uji *in vitro*: menggunakan strain MRSA standar (ATCC 43300) dengan metode difusi cakram dan penentuan MIC.
6. Uji *in vivo*: menggunakan mencit (*Mus musculus*) dengan model luka kulit terinfeksi MRSA. Parameter uji yang diukur antara lain perubahan diameter luka sebelum dan sesudah aplikasi gel protease.

1.5. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat sebagai berikut:

1. **Pengembangan ilmu:** memperluas pengetahuan tentang keanekaragaman bakteri laut Indonesia, khususnya Sulawesi Selatan, sebagai sumber protease dan kontribusi terhadap pengembangan antimikroba ramah lingkungan.
2. **Kesehatan:** menyediakan kandidat agen antimikroba berbasis protease untuk mengatasi infeksi MRSA dengan mekanisme berbeda dari antibiotik konvensional, sehingga menekan risiko resistensi baru.
3. **Metodologi:** menghasilkan protokol standar dan model prediktif eksplorasi enzim bioaktif laut yang dapat diadopsi dalam penelitian perancangan obat rasional.
4. **Pembangunan:** mendukung kemandirian farmasi nasional dan pengembangan biofarmaka lokal dalam kerangka ekonomi kelautan.

1.6 Ruang lingkup penelitian

Disertasi ini terdiri atas delapan bab dengan cakupan sebagai berikut:

1. Bab II: Isolasi, skrining, dan identifikasi bakteri laut penghasil protease.
2. Bab III: Produksi, karakterisasi, dan purifikasi protease.
3. Bab IV: Analisis protease hasil purifikasi dengan LC-MS/MS serta studi *in silico* interaksi dengan protein MRSA.
4. Bab V: Uji *in vitro* aktivitas protease terhadap MRSA.
5. Bab VI: Uji *in vivo* aktivitas protease pada model mencit terinfeksi MRSA.
6. Bab VII: Analisis integratif dan pembahasan komprehensif hasil penelitian Bab II–VI.
7. Bab VIII: Kesimpulan dan saran penelitian lanjutan.

1.7 Kebaruan penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa aspek kebaruan yang membedakannya dari penelitian-penelitian sebelumnya, baik dari segi sumber isolat, pendekatan metodologi, maupun aplikasi terapeutik. Aspek kebaruan penelitian ini meliputi:

1. **Eksplorasi sumber lokal:** kajian pertama terhadap bakteri penghasil protease dari Pantai Losari, Makassar, sebagai kandidat anti-MRSA.
2. **Pendekatan integratif:** kombinasi analisis *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* untuk memahami mekanisme kerja protease secara menyeluruh.
3. **Aplikasi terapeutik:** menawarkan paradigma baru terapi enzimatis berbasis protease sebagai alternatif antibiotik konvensional, dengan potensi mendukung program ekonomi kelautan dan kemandirian farmasi nasional.

1.8 Landasan teoritis

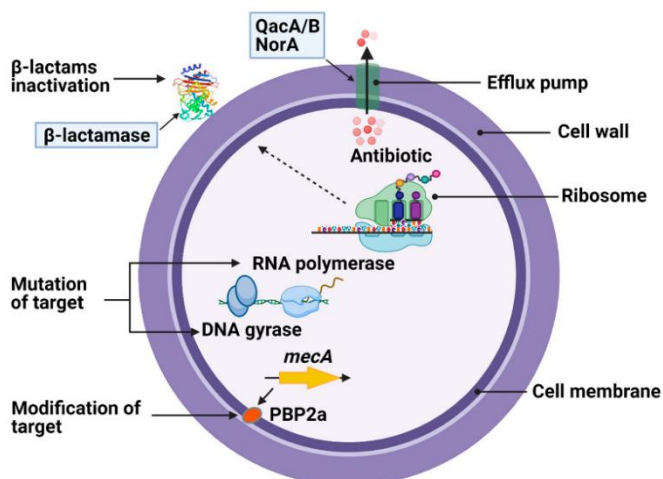
1.8.1 Tinjauan umum *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan bakteri Gram positif yang umum ditemukan pada kulit dan membran mukosa manusia (Abebe & Birhanu, 2023). Bakteri ini termasuk dalam famili *Staphylococcaceae* dan memiliki bentuk bulat (kokus) (**Gambar 1.1**). Struktur sel MRSA yang ditampilkan meliputi beberapa komponen utama. Bagian terluar adalah dinding sel (cell wall) yang berwarna ungu, merupakan struktur pelindung utama bakteri dan menjadi salah satu target kerja antibiotik β -laktam. Bagian bawah dinding sel terdapat membran sel yang berfungsi sebagai pembatas selektif antara bagian dalam dan luar sel, serta tempat protein pompa efluks (QacA/B dan NorA) berada untuk mengeluarkan antibiotik dari dalam sel. Sitoplasma sel mengandung ribosom yang berperan dalam sintesis protein dan menjadi target beberapa jenis antibiotik seperti tetrasiklin, aminoglikosida, dan makrolida. Komponen penting lainnya adalah DNA gyrase dan RNA polymerase yang berperan dalam replikasi DNA dan transkripsi RNA, keduanya merupakan target dari beberapa jenis antibiotik. Gen *mecA* yang mengkode protein PBP2a (Penicillin-Binding Protein 2a), yang merupakan faktor kunci resistensi MRSA terhadap antibiotik β -laktam. Struktur-struktur ini saling bekerja sama dalam menjalankan fungsi kehidupan bakteri sekaligus menjadi target dan mekanisme pertahanan terhadap antibiotik.

MRSA dapat bertahan dalam berbagai kondisi lingkungan dan memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm yang melindunginya dari sistem imun inang maupun antimikroba. Namun, jika bakteri ini masuk ke dalam tubuh melalui luka atau prosedur invasif, berbagai enterotoksin dan racun lainnya akan dikeluarkan (Liu et al., 2024; Rasquel-Oliveira et al., 2025; Shoaib et al., 2023). Hal ini dapat memicu respons inflamasi dan menyebabkan berbagai kondisi patologis yang serius, meliputi infeksi kulit seperti *dermatitis atopik*, *psoriasis*, dan *impetigo*; gangguan pernapasan seperti fibrosis kistik paru dan asma; reaksi hipersensitivitas (alergi); serta infeksi sistemik seperti meningitis dan osteomyelitis. Selain itu, kondisi ini juga dapat berkontribusi terhadap penyakit autoimun seperti *sarcoidosis* dan *multiple sclerosis* (Chen et al., 2022; Rasquel-Oliveira et al., 2025). Menurut data World Health Organization (WHO), infeksi MRSA menyebabkan tingkat mortalitas yang mencapai 2-40% pada kasus bakteremia, dengan angka kematian yang lebih tinggi dibandingkan infeksi *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap metisilin (Hasanpour et al., 2023; Hassoun et al., 2017).

MRSA merupakan bakteri patogen yang menunjukkan resistensi yang tinggi terhadap hampir semua antibiotik β -laktam, termasuk metisilin, penisilin, ampisilin, makrolida, aminoglikosida, fluorokuinolon, vankomisin, teicoplanin, dan sebagian besar sefalosporin generasi pertama hingga ketiga (Jubeh et al., 2020; Maddiboyina et al., 2023; de Oliveira Santos et al., 2022). Kemampuan MRSA untuk membentuk biofilm yang resisten, mentransfer gen resistensi melalui plasmid, dan mengembangkan mekanisme pertahanan yang kompleks telah menjadikannya

sebagai patogen nosokomial utama yang sulit dieradikasi dari lingkungan rumah sakit maupun komunitas (Brdová et al., 2024; Kaushik et al., 2024; Uddin et al., 2021).



Gambar 1.1. Morfologi dan struktur sel MRSA

(Sumber: https://www.mdpi.com/antibiotics/antibiotics-10-00398/article_deploy/html/images/antibiotics-10-00398-g001.png)

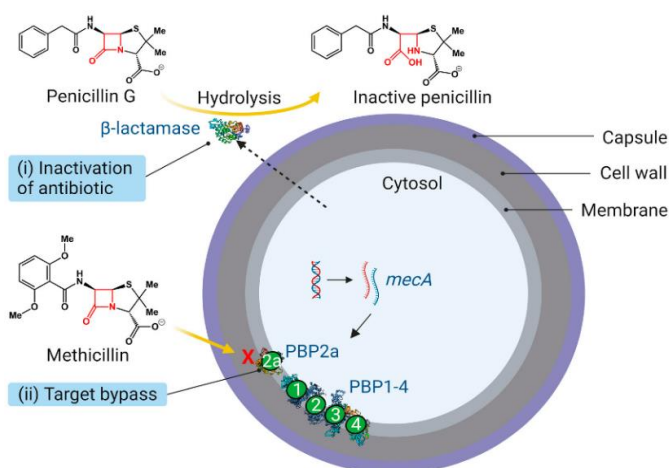
Secara epidemiologis, MRSA diklasifikasikan menjadi dua kategori utama berdasarkan tempat akuisisi infeksi, yaitu MRSA dalam lingkup rumah sakit (hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) dan MRSA pada lingkup komunitas (community-acquired MRSA (CA-MRSA) (Shoaib et al., 2022). HA-MRSA umumnya menginfeksi pasien yang menjalani perawatan di fasilitas kesehatan, terutama mereka yang memiliki faktor risiko seperti riwayat operasi, penggunaan kateter, ventilator mekanik, atau memiliki sistem imun yang lemah (Tsouklidis et al., 2020). Sementara itu, CA-MRSA dapat menginfeksi individu sehat di komunitas tanpa riwayat kontak dengan fasilitas kesehatan, sering dikaitkan dengan kondisi kepadatan populasi tinggi seperti asrama, penjara, atau fasilitas olahraga (Kong et al., 2016). Peningkatan kasus MRSA yang berkelanjutan ini telah mendorong WHO untuk memasukkan MRSA ke dalam daftar patogen prioritas tinggi yang memerlukan perhatian khusus dalam pengembangan antimikroba baru dan strategi pencegahan infeksi yang lebih efektif (Shaari & Bakar, 2023)

1.8.2 Mekanisme resistensi MRSA terhadap antibiotik

Resistensi MRSA disebabkan oleh adanya mekanisme spesifik yang dikembangkan oleh MRSA sendiri terhadap antibiotik golongan β-laktam (Alghamdi et al., 2023; Brdová et al., 2024). Mekanisme resistensi ini terutama disebabkan oleh produksi protein pengikat penisilin 2a (PBP2a) yang dikode oleh gen *mecA* (Rosado et al., 2025; Shalaby et al., 2020). Protein ini memiliki afinitas yang rendah terhadap

antibiotik β -laktam, sehingga memungkinkan bakteri untuk melanjutkan sintesis dinding sel meskipun terpapar antibiotik (Fergestad et al., 2020; Rosado, et al., 2025).

MRSA juga mengembangkan berbagai mekanisme resistensi tambahan seperti produksi β -laktamase, modifikasi target antibiotik, sistem pompa efflux (pompa efflux (efflux pump)) yang aktif, dan pembentukan biofilm yang memberikan perlindungan fisik terhadap penetrasi antimikroba (Belay et al., 2024; Uruén et al., 2021). Kompleksitas mekanisme resistensi ini telah mendorong kebutuhan mendesak untuk mengembangkan strategi terapeutik alternatif yang dapat mengatasi keterbatasan antibiotik konvensional (**Gambar 1.2**).



Gambar 1.2 Mekanisme resistensi MRSA terhadap antibiotik β -laktam
(Sumber : https://pub.mdpi-res.com/antibiotics/antibiotics-12-01362/article_deploy/html/images/antibiotics-12-01362-g003.png?1724806962)

Gen *mecA* yang mengkode protein PBP2a merupakan elemen genetik mobile yang terdapat pada *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) (Liu et al., 2016; Rosado et al., 2025; Shalaby et al., 2020). Terdapat berbagai tipe SCCmec yang telah diidentifikasi, masing-masing memiliki karakteristik genetik yang berbeda dan berkontribusi terhadap variasi pola resistensi MRSA (Uehara, 2022). Protein PBP2a memiliki struktur yang berbeda dengan PBP normal, dimana sisi aktifnya termodifikasi sehingga mengurangi kemampuan antibiotik β -laktam untuk berikatan dan menghambat aktivitas transpeptidase yang esensial untuk sintesis peptidoglikan dinding sel bakteri (Lim & Strynadka, 2002; Uehara, 2022).

Sistem pompa efflux pada MRSA merupakan mekanisme resistensi yang penting, dimana protein transporter aktif yang terdapat pada membran sel bakteri akan memompa keluar molekul antibiotik yang masuk ke dalam sel (Gaurav et al., 2023). Beberapa jenis pompa efflux yang telah diidentifikasi pada MRSA antara lain NorA, NorB, dan NorC yang termasuk dalam famili fasilitator utama (MFS) (Hassanzadeh et al., 2020). Sistem ini dapat mengeluarkan berbagai jenis antibiotik

termasuk fluorokuinolon, sehingga berkontribusi terhadap resistensi multi-drug pada MRSA.

Pembentukan biofilm oleh MRSA memberikan perlindungan tambahan terhadap antibiotik dan sistem imun inang (Sharif & Yadav, 2025). Biofilm merupakan komunitas bakteri yang tertanam dalam matriks ekstraseluler yang terdiri dari polisakarida, protein, dan DNA ekstraseluler (Karygianni et al., 2020; Zhao et al., 2023). Struktur biofilm ini menciptakan gradien konsentrasi nutrisi dan oksigen yang menyebabkan heterogenitas metabolik dalam populasi bakteri, dimana sel-sel di bagian dalam biofilm berada dalam kondisi pertumbuhan lambat (Jo et al., 2022; Shree et al., 2023).

1.8.3 Biodiversitas laut sebagai sumber senyawa bioaktif

Lingkungan laut yang meliputi 70% permukaan bumi memiliki keragaman filogenetik yang jauh lebih besar dibandingkan lingkungan terestrial (Cantonati et al., 2020; Srinivasan et al., 2021). Berbagai jenis bakteri laut telah berevolusi untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan ekstrem, seperti intensitas cahaya rendah, tekanan tinggi, pH asam, suhu rendah, serta variasi kandungan oksigen dan salinitas (Martínez et al., 2022). Adaptasi terhadap kondisi ekstrem ini mendorong bakteri laut menghasilkan produk metabolit primer dan sekunder dengan struktur kimia unik serta bioaktivitas yang kompleks (Barzkar et al., 2023).

Bakteri laut juga mampu mengeluarkan metabolit bioaktif sebagai upaya mekanisme pertahanan terhadap predator atau komponen lingkungan yang berpotensi berbahaya, sekaligus sebagai strategi kompetisi untuk memperoleh nutrisi (seperti sumber karbon) dari lingkungan atau organisme inangnya (Barzkar et al., 2023; Shree et al., 2023). Kondisi lingkungan laut yang ekstrem, seperti tekanan tinggi, salinitas tinggi, pH yang bervariasi, dan fluktuasi suhu, telah memaksa bakteri laut untuk menghasilkan enzim dan senyawa bioaktif dengan stabilitas dan aktivitas yang superior dibandingkan dengan mikroorganisme terestrial (Alves & Kijjoa 2020; Dalmaso et al., 2015).

Ekosistem laut Indonesia mencakup berbagai habitat unik seperti terumbu karang, laut dalam, zona hidrothermal, dan sedimen laut yang menjadi rumah bagi jutaan mikroorganisme dengan potensi bioaktif yang tinggi (Corinaldesi, 2015). Bakteri laut yang hidup di lingkungan ekstrem ini telah mengembangkan mekanisme adaptasi yang unik, termasuk produksi metabolit sekunder bioaktif sebagai strategi bertahan hidup dan kompetisi dengan mikroorganisme lainnya (Pardo-Esté et al., 2024). Senyawa bioaktif yang diproduksi oleh mikroorganisme laut, khususnya bakteri ini, menarik perhatian peneliti karena keragaman struktural dan potensi farmakologisnya yang tinggi (Alves & Kijjoa 2020; Barzkar et al., 2023). Banyak kandidat senyawa farmasi baru telah diisolasi dari sedimen laut dan bakteri yang berasosiasi dengan organisme (Santos et al., 2020; Srinivasan et al., 2021). Berbagai genus bakteri laut yang telah diidentifikasi sebagai penghasil senyawa bioaktif antara lain *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, dan *Nocardia*

yang diisolasi dari berbagai habitat laut termasuk sedimen, kolom air, dan organisme laut (Ameen et al., 2021).

Indonesia, sebagai negara kepulauan terbesar di dunia dengan garis pantai sepanjang lebih dari 81.000 kilometer, memiliki kekayaan biodiversitas laut yang luar biasa dan sebagian besar belum dieksplorasi secara optimal (Akbar, 2022). Berbagai habitat laut Indonesia dan karakteristik lingkungannya yang mendukung (Akbar, 2022) produksi metabolit bioaktif dapat dilihat pada **Tabel 1.1**.

Tabel 1.1 Habitat laut Indonesia dan karakteristik lingkungannya

Habitat Laut	Karakteristik Lingkungan	Genus Bakteri Dominan	Potensi Metabolit Bioaktif
Sedimen laut	Tekanan tinggi, suhu rendah, anaerobic	<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Pseudomonas</i>	Enzim ekstraselular, antibiotik
Terumbu karang	Salinitas tinggi, kompetisi nutrisi tinggi	<i>Vibrio</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Bacillus</i>	Senyawa anti-fouling, antimikroba
Laut dalam	Tekanan sangat tinggi, suhu rendah, gelap	<i>Psychrobacter</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Colwellia</i>	Enzim psikrofilik, senyawa unik
Zona hidrothermal	Suhu tinggi, pH ekstrem, mineral tinggi	<i>Thermococcus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Bacillus</i>	Enzim termostabil
Mangrove	Fluktuasi salinitas, pH variabel	<i>Streptomyces</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Bacillus</i>	Antibiotik, enzim adaptif
Sponge laut	Simbiosis,	<i>Pseudovibrio</i>	Senyawa antimikroba

Sumber: Ameen et al., 2021; Akbar, 2022

1.8.4 Protease dari bakteri laut

Enzim yang dihasilkan oleh bakteri laut memiliki banyak aplikasi dalam bioindustri (Rao et al., 2017), termasuk enzim seperti amilase, lipase, protease, gelatinase, selulase, dan kitinase (Beygmoradi & Homaei, 2017). Enzim-enzim ini stabil secara termal, tahan terhadap berbagai nilai pH dan kondisi ekstrim lainnya yang diperlukan untuk aplikasi industri dan memiliki aplikasi biologis yang terkait dengan kesehatan manusia (Ashaolu et al., 2025).

Protease, sebagai salah satu kelompok enzim terbesar yang dihasilkan oleh bakteri laut, menunjukkan potensi yang sangat menjanjikan sebagai agen antimikroba terbaru (Solanki et al., 2021). Enzim proteolitik ini memiliki kemampuan untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein target secara spesifik, yang dapat dimanfaatkan untuk mendegradasi komponen protein esensial pada patogen bakteri (Culp & Wright 2017). Protease yang dihasilkan oleh bakteri laut memiliki

karakteristik yang unik dan berbeda dengan protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme terrestrial (Barzkar, 2020; Cheng et al., 2020). Karakteristik unik protease dari bakteri laut, seperti stabilitas terhadap kondisi ekstrem, aktivitas optimal pada rentang pH dan suhu yang luas, serta resistensi terhadap inhibitor protease endogen, menjadikannya sebagai kandidat ideal untuk aplikasi terapeutik (Noskova et al., 2025). Protease bakteri laut umumnya memiliki aktivitas katalitik yang tinggi, spesifisitas substrat yang luas, dan kemampuan untuk tetap aktif dalam kondisi salinitas tinggi yang mencerminkan adaptasi mereka terhadap lingkungan laut (Barzkar et al., 2023).

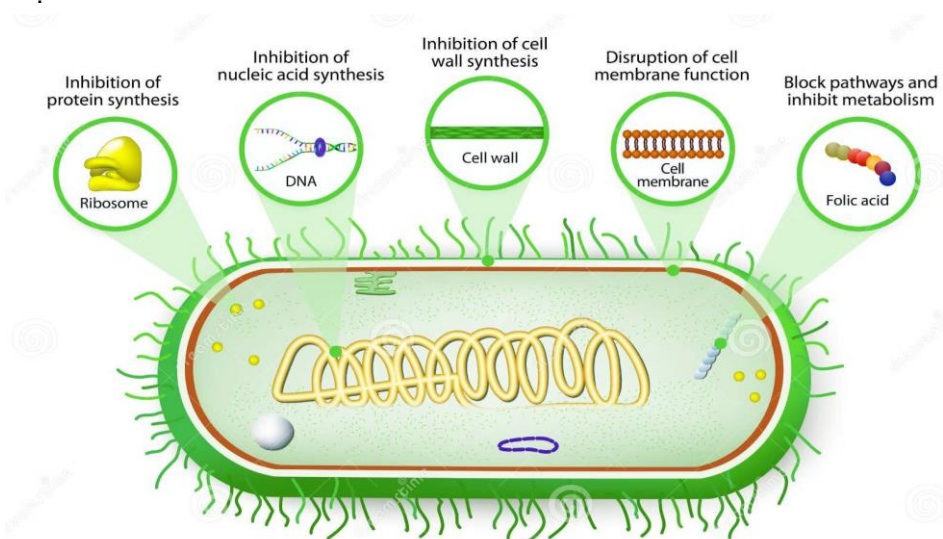
1.8.5 Mekanisme kerja protease sebagai agen antimikroba

Mekanisme kerja protease sebagai agen antimikroba melibatkan degradasi protein struktural dan fungsional pada sel target, termasuk protein dinding sel, protein membran, enzim metabolik esensial, dan faktor virulensi (Ishikawa et al., 2024). Protease dapat menghidrolisis peptidoglikan pada dinding sel bakteri, menyebabkan lisis osmotik dan kematian sel (Ramírez et al., 2022).

Protease dapat menghidrolisis peptidoglikan pada dinding sel bakteri, menyebabkan lisis osmotik dan kematian sel (Ramírez et al., 2022), serta mendegradasi protein adhesin yang berperan dalam pembentukan biofilm, protein toxin yang bertanggung jawab terhadap patogenitas, dan enzim resistensi yang memberikan ketahanan terhadap antimikroba (Sharma et al., 2023). Keunggulan protease sebagai agen antimikroba terletak pada mekanisme kerjanya yang berbeda dengan antibiotik konvensional, dimana protease dapat menyerang multiple target protein secara simultan, sehingga mengurangi kemungkinan terbentuknya resistensi (Balenahalli et al., 2024). Spesifisitas protease terhadap sekuen asam amino tertentu memungkinkan pengembangan terapi yang lebih terarah dan selektif, dengan resiko efek samping yang minimal terhadap sel inang (Ratnikov et al., 2021).

Degradasi peptidoglikan oleh protease terjadi melalui hidrolisis ikatan peptida pada jembatan peptida yang menghubungkan rantai glikan dalam struktur peptidoglikan (Brogan & Rudner, 2023). Proses ini melemahkan integritas struktural dinding sel bakteri dan menyebabkan sel menjadi rentan terhadap tekanan osmotik (Yadav et al. 2018). Ketika integritas dinding sel terganggu, tekanan turgor internal sel akan menyebabkan lisis sel dan kematian bakteri. Mekanisme ini sangat efektif terhadap bakteri Gram positif seperti MRSA yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal (Han et al., 2023; Wong & Amir, 2019).

Protease juga dapat mendegradasi protein membran yang berperan penting dalam berbagai fungsi sel bakteri termasuk transport nutrisi, komunikasi sel, dan pemeliharaan gradien elektrokimia (Lee, 2025). Degradasi protein membran dapat menyebabkan kebocoran komponen intraseluler, gangguan homeostasis ion, dan hilangnya energi seluler (Stewart et al., 2018). Selain itu, beberapa protease memiliki kemampuan untuk mendegradasi faktor virulensi MRSA seperti protein A yang berfungsi dalam evasion imun, alfa toksin yang menyebabkan lisis sel inang, dan koagulase yang melindungi bakteri dari fagositosis (Girma, 2025).



Gambar 1.3. Ilustrasi mekanisme kerja protease sebagai agen antimikroba terhadap MRSA

(Sumber: <https://images.search.yahoo.com/search/images; ylt=AwrKGJhI6SNpBwIA4OKJzbf; ylu=Y29sbwNzZzMEcG9zAzI1BHZ0aWQDBHNIYwNzcg--?fr=mcafee&p=Illustration+of+the+mechanism+of+action+of+protease+as+an+antimicrobial+agent+against+MRSA&imgurl=https%3A%2F%2Fthumbs.dreamstime.com%2Fz%2Fmechanisms-action-antimicrobials-antibiotic-60642778.jpg>)

Gambar 1.3 mengilustrasikan berbagai mekanisme kerja protease sebagai agen antibakteri melalui lima target utama dalam sel bakteri. Pertama, protease menghambat sintesis protein dengan mendegradasi ribosom atau protein-protein yang terlibat dalam proses translasi. Kedua, protease menghambat sintesis asam nukleat dengan menargetkan protein-protein yang berperan dalam replikasi dan transkripsi DNA. Ketiga, protease menghambat sintesis dinding sel dengan mendegradasi enzim-enzim pembentuk peptidoglikan atau protein struktural dinding sel, sehingga integritas dinding sel terganggu dan bakteri menjadi rentan terhadap lisis. Keempat, protease menyebabkan disrupsi fungsi membran sel dengan memecah protein membran, mengakibatkan kebocoran komponen intraseluler dan gangguan homeostasis sel. Kelima, protease memblokir jalur metabolisme dan menghambat metabolisme sel bakteri melalui degradasi enzim-enzim metabolik seperti yang terlibat dalam jalur asam folat. Mekanisme multi-target ini menunjukkan keunggulan protease dibandingkan antibiotik konvensional yang umumnya hanya memiliki satu target spesifik, sehingga kemungkinan bakteri mengembangkan resistensi menjadi lebih kecil karena bakteri harus mengembangkan mekanisme pertahanan terhadap beberapa serangan sekaligus.

Degradasi komponen biofilm ini dapat mencegah pembentukan biofilm baru atau merusak biofilm yang telah terbentuk, sehingga meningkatkan kerentanan bakteri terhadap sistem imun dan antimikroba (Grari et al., 2025). Kemampuan ini sangat penting dalam konteks infeksi MRSA yang seringkali terkait dengan pembentukan biofilm pada permukaan medis atau jaringan inang (Wang et al., 2023). Berbagai genus bakteri laut yang telah diidentifikasi sebagai penghasil protease seperti yang dijelaskan pada **Tabel 1.2** di bawah ini:

Tabel 1. 2 Penelitian protease dari bakteri laut dengan aktivitas antimikroba

Sumber Bakteri	Genus/spesies	Asal Isolat	Tipe Protease	Target Patogen	Aktivitas	Referensi
Sedimen laut Capsican	<i>Streptomyces sp.</i>	Laut Capsican	Serin protease	MRSA, VRE	Zona hambat signifikan	Norouzi, et al., 2018
Laut Cina	<i>Bacillus subtilis</i> KIBGE-IB17	Laut Cina	Bacteriocin (BAC-IB17)	MRSA	MIC 25 µg/mL	Ansari et al., 2018
Sedimen laut Mesir	<i>Streptomyces sp.</i>	Laut Mesir	Alkalin protease	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>	Zona hambat 12-18 mm	Rashad et al., 2015
Sedimen laut Brazil	<i>Bacillus sp.</i>	Laut Brazil	Metalo protease	<i>C. fimi</i> NCTC 7547	Aktivitas proteolitik tinggi	Jankoski et al., 2021
Laut Merah, Saudi Arabia	<i>Vibrio sp.</i> EA348	Laut Merah	Ekstraselular protease	<i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i>	MIC 50-100 µg/mL	Bibi et al., 2020
Laut Afrika Selatan	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Afrika Selatan	Alkalin protease	<i>L. monocytogenes</i> , STEC	Zona hambat 15-20 mm	Ngema et al., 2023
Sedimen laut India	<i>Bacillus sp.</i> APCMST-RS7	India	Alkalin protease	Berbagai patogen	Aktivitas antioksidan	Maruthiah, et al., 2017

1.8.6 Pendekatan *in silico* dalam karakterisasi protease

Pendekatan *in silico* merupakan metode komputasional yang digunakan untuk memprediksi dan menganalisis struktur, fungsi, dan interaksi molekuler protein termasuk protease (Agamah et al., 2020). Metode ini melibatkan berbagai teknik bioinformatika dan pemodelan molekuler yang dapat memberikan informasi penting sebelum dilakukan eksperimen laboratorium. Analisis *in silico* dapat menghemat waktu dan biaya penelitian dengan memprediksi kandidat protease yang paling potensial untuk dievaluasi lebih lanjut secara eksperimental (Chen et al., 2023).

Teknik molekuler docking merupakan salah satu metode *in silico* yang paling banyak digunakan untuk memprediksi interaksi antara protease dengan protein

target pada patogen (Kumar & Kumar 2019; Pinzi & Rastelli 2019). Molekular docking dapat memodelkan bagaimana protease berikatan dengan substrat proteinnya dan mengidentifikasi residu asam amino yang penting untuk interaksi tersebut (Fanelli & Sullivan 2023; Ashutosh et al., 2017). Metode ini menggunakan algoritma untuk mencari konformasi optimal dari kompleks protein-substrat berdasarkan energi ikatan dan komplementaritas struktural (Anushree et al., 2017).

Simulasi dinamika molekuler merupakan teknik lanjutan yang dapat memodelkan pergerakan atom dan molekul dalam sistem biologis selama periode waktu tertentu (Padhi et al., 2022). Metode ini dapat memberikan informasi tentang stabilitas kompleks protease-substrat, perubahan konformasi yang terjadi selama katalisis, dan faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim (Agu et al., 2023). Simulasi dinamika molekuler dapat mengungkap mekanisme katalitik protease pada tingkat atomik dan memprediksi efek mutasi atau modifikasi pada aktivitas enzim (Sun et al., 2024). Berbagai perangkat bioinformatika yang digunakan dalam analisis *in silico* protease dapat dilihat pada Tabel 1.3.

Tabel 1.3 Perangkat bioinformatika untuk analisis *in silico*

Tools/ Software	Fungsi Utama	Database/ Algoritma	Output	Website/Platform
BLAST	Pencarian homologi sekuens	NCBI, UniProt	Similaritas sekuens, identifikasi protein	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Clustal Omega	Multiple sequence alignment	Progressive alignment	Alignment sekuens, pohon filogenetik	https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/
SWISS-MODEL	Homology modeling	Template-based modeling	Model struktur 3D protein	https://swissmodel.expasy.org/
AutoDock Vina	Molekular docking	Lamarckian genetic algorithm	Binding affinity, konformasi kompleks	https://autodock-vina.readthedocs.io/en/latest/index.html
GROMACS	Simulasi dinamika molekuler	Force field (AMBER, CHARMM)	Trajektori, energi, stabilitas	https://www.gromacs.org/

Sumber: Nguyen et al., 2025

Analisis bioinformatika pada urutan protein dapat digunakan untuk menemukan bagian yang berfungsi sebagai katalis, pola urutan yang dipertahankan, dan hubungan kekerabatan evolusi protease (Wang et al., 2021). Perbandingan sekuens dengan database protein dapat membantu mengklasifikasikan protease ke dalam

famili tertentu dan memprediksi sifat-sifat biokimianya (Nguyen et al., 2025). Analisis struktur tiga dimensi protease dapat mengidentifikasi sisi aktif katalitik, kantong substrat binding, dan residu penting untuk stabilitas dan aktivitas enzim (Riziotis & Thornton, 2022).

1.8.7 Karakterisasi *in vitro* protease dan aktivitas anti-MRSA

Karakterisasi *in vitro* protease melibatkan serangkaian uji biokimia untuk menentukan sifat-sifat enzim termasuk aktivitas spesifik, pH optimum, suhu optimum, stabilitas termal, dan spesifisitas substrat (Filippova et al., 2024). Uji aktivitas proteolitik umumnya dilakukan dengan mengukur pelepasan produk hidrolisis protein menggunakan berbagai metode analitik seperti metode Lowry, metode Bradford, atau kromatografi (Jain et al., 2020).

Penentuan pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas protease pada berbagai nilai pH menggunakan buffer yang sesuai (Bowman et al., 2020). Protease dari bakteri laut dapat memiliki pH optimum yang bervariasi tergantung pada adaptasi mereka terhadap lingkungan asalnya (Mougi, 2024). Penentuan suhu optimum dan stabilitas termal dilakukan dengan menginkubasi protease pada berbagai suhu dan mengukur aktivitas residual setelah periode inkubasi tertentu (Salehi, 2024). Informasi ini penting untuk menentukan kondisi optimal produksi dan aplikasi protease.

Evaluasi aktivitas anti-MRSA secara *in vitro* dilakukan melalui berbagai metode pengujian antimikroba (Balouiri et al., 2016). Uji difusi agar merupakan metode skrining awal yang sederhana untuk mendeteksi aktivitas antimikroba berdasarkan pembentukan zona hambat pertumbuhan bakteri (Hossain, 2024). Uji penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) memberikan informasi kuantitatif tentang konsentrasi minimum protease yang diperlukan untuk menghambat dan membunuh MRSA (Rodríguez-Melcón et al., 2021).

Analisis mekanisme kerja protease terhadap MRSA dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan eksperimental. Mikroskopi elektron dapat digunakan untuk mengamati perubahan morfologi sel MRSA setelah perlakuan dengan protease (Czerwi, 2021; Golding et al., 2016). Analisis protein dapat mengidentifikasi protein target yang didegradasi oleh protease menggunakan teknik elektroforesis dan spektrometri massa (Sathe & Sapkota, 2023). Uji permeabilitas membran dapat mendeteksi kerusakan membran sel yang disebabkan oleh aktivitas protease (Venkataswamy et al., 2023).

1.8.8 Validasi protease sebagai agen anti-MRSA secara *in vivo*

Validasi *in vivo* merupakan tahapan krusial dalam pengembangan protease sebagai agen anti-MRSA untuk memastikan efektivitas dan keamanan dalam sistem biologis yang kompleks (Venkataswamy et al., 2023). Evaluasi *in vivo* menggunakan model hewan uji dapat memberikan informasi tentang farmakokinetik, farmakodinamik, efikasi terapeutik, dan toksisitas protease (Hartung et al., 2024). Model hewan yang

umum digunakan dalam penelitian anti-MRSA antara lain mencit, tikus, dan kelinci dengan berbagai model infeksi (Hickman et al., 2017).

Model infeksi kulit merupakan model yang relevan untuk mengevaluasi efektivitas protease terhadap infeksi MRSA karena kulit merupakan situs infeksi yang umum (Youn et al., 2020). Model ini dapat dibuat dengan menginfeksi MRSA secara subkutan atau intradermal dan mengamati perkembangan lesi, jumlah bakteri pada situs infeksi, dan respons inflamasi (Zhang et al., 2021). Perlakuan dengan protease dapat dilakukan secara topikal atau sistemik dan efektivitasnya dievaluasi berdasarkan pengurangan ukuran lesi, penurunan beban bakteri, dan percepatan penyembuhan luka (Ćwilichowska et al., 2022).

Model sepsis dapat digunakan untuk mengevaluasi efektivitas protease terhadap infeksi sistemik MRSA yang mengancam jiwa (Ćwilichowska et al., 2022). Model ini melibatkan injeksi MRSA secara intravena atau intraperitoneal dan monitoring kemampuan hidup, beban bakteri pada organ target, dan marker inflamasi sistemik (Atre et al., 2024). Perlakuan dengan protease dapat diberikan pada berbagai waktu relatif terhadap infeksi untuk mengevaluasi kemampuan profilaktik maupun terapeutik (Marshall et al., 2017).

Evaluasi keamanan dan toksisitas protease merupakan aspek penting dalam validasi *in vivo* (Ćwilichowska et al., 2022). Parameter yang dievaluasi meliputi toksisitas akut dan kronik, immunogenisitas, dan efek samping pada organ target. Analisis histopatologi dapat mendeteksi kerusakan jaringan yang disebabkan oleh protease (Alipkina et al., 2021). Pemantauan parameter darah dan kimia serum dapat mengidentifikasi disfungsi organ. Uji immunogenisitas dapat mendeteksi pembentukan antibodi terhadap protease yang dapat mengurangi efektivitas atau menyebabkan reaksi hipersensitivitas (Metra et al., 2022).

Analisis farmakokinetik protease melibatkan penentuan absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi enzim dalam tubuh (Ghazi & Cawley, 2021). Parameter farmakokinetik seperti waktu paruh, volume distribusi, dan clearance dapat digunakan untuk merancang regimen dosis yang optimal (Glassman & Muzykantov, 2019). Analisis farmakodinamik mengkaji hubungan antara konsentrasi protease dengan efek antimikroba untuk menentukan konsentrasi target yang diperlukan untuk efikasi terapeutik (Alikhani et al., 2025).

1.8.9 Integrasi pendekatan *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo*

Pendekatan integratif yang menggabungkan analisis *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* memberikan pemahaman yang komprehensif tentang potensi protease dari bakteri laut sebagai agen anti-MRSA. Setiap pendekatan memiliki kelebihan dan keterbatasan yang saling melengkapi. Analisis *in silico* dapat memprediksi kandidat protease yang potensial dan mekanisme kerjanya pada tingkat molekuler, sehingga mengarahkan prioritas untuk karakterisasi eksperimental (Kumar et al., 2020).

Hasil analisis *in silico* dapat divalidasi dan diperluas melalui karakterisasi *in vitro* yang memberikan data eksperimental tentang sifat biokimia protease dan aktivitas antimikroba terhadap MRSA (Rampone et al., 2021). Korelasi antara prediksi *in silico*

dengan hasil *in vitro* dapat digunakan untuk memperbaiki model komputasional dan meningkatkan akurasi prediksi untuk kandidat protease lainnya (Rampone et al., 2021). Identifikasi target protein spesifik pada MRSA yang didegradasi oleh protease secara *in vitro* dapat dikonfirmasi dengan hasil molekular docking *in silico*.

Karakterisasi *in vitro* memberikan informasi fundamental yang diperlukan untuk merancang studi *in vivo* yang efisien. Parameter seperti konsentrasi efektif, stabilitas enzim, dan spesifisitas dapat digunakan untuk menentukan dosis, rute administrasi, dan frekuensi pemberian dalam model hewan. Namun, aktivitas *in vitro* tidak selalu berkorelasi dengan efektivitas *in vivo* karena kompleksitas sistem biologis termasuk bioavailabilitas, distribusi, metabolisme, dan interaksi dengan sistem imun.

Validasi *in vivo* memberikan konfirmasi akhir tentang efikasi terapeutik dan keamanan protease dalam kondisi fisiologis yang relevan. Data *in vivo* dapat mengidentifikasi limitasi atau tantangan yang tidak terdeteksi dalam studi *in silico* dan *in vitro*, seperti imunogenisitas, kejelasan yang cepat, atau ketidakstabilan dalam serum. Informasi ini dapat digunakan untuk memodifikasi atau mengoptimalkan protease melalui protein engineering yang dipandu oleh analisis *in silico* untuk meningkatkan sifat farmakologis.

Siklus literatif antara pendekatan *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* memungkinkan optimalisasi rasional protease sebagai agen anti-MRSA. Modifikasi struktur protease yang diprediksi secara *in silico* dapat meningkatkan stabilitas, aktivitas, atau mengurangi imunogenisitas dapat diverifikasi melalui ekspresi rekombinan dan karakterisasi *in vitro*, kemudian divalidasi *in vivo*. Pendekatan integratif ini mempercepat proses pengembangan dengan mengurangi uji coba berulang dan berfokus pada kandidat yang paling menjanjikan berdasarkan data multi-platform yang telah dijelaskan pada **Tabel 1.4**.

Tabel 1.4 Perbandingan kelebihan dan keterbatasan pendekatan *in silico*, *in vitro*, dan *In vivo*

Aspek	<i>In silico</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Kecepatan	Sangat cepat (jam-hari)	Cepat-sedang (hari-minggu)	Lambat (minggu-bulan)
Biaya	Sangat rendah	Sedang	Tinggi
Hasil/kapasitas	Sangat tinggi	Tinggi	Rendah
Prediktabilitas	Prediksi teoritis	Data eksperimental terbatas	Data paling relevan untuk aplikasi
Informasi mekanisme	Detail interaksi molekuler	Mekanisme biokimia	Mekanisme fisiologis
Etika	Tidak ada isu etika	Tidak ada isu etika	Memerlukan persetujuan etik
Keterbatasan	Akurasi tergantung model	Tidak memperhitungkan faktor <i>in vivo</i>	Variabilitas biologis tinggi
Aplikasi utama	Screening, prediksi struktur- fungsi	Karakterisasi biokimia, bukti konsep	Validasi efikasi dan keamanan
Contoh output	Binding energy, struktur kompleks	IC ₅₀ , MIC, aktivitas spesifik	ED ₅₀ , survival rate, histopathology

Sumber: Rampone et al., 2021

1.9 Daftar pustaka

- Abebe AA, & Birhanu AG. 2023. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: Molecular mechanisms underlying drug resistance development, novel strategies to combat infection. *Drug Resistance*, 16(11), 7641–7662. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428103>.
- Agamah FE, Mazdanu GK, Hassan R, Bope CD, Thomford NE, Ghansah A, & Chimusa ER. 2020. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Briefings in Bioinformatics*, 21(5), 1663–1675. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz103>.
- Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezech EM, Ofoke IH, Ogbu CO, Ugwuja EI, & Aja PM. 2023. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in disease management. *Scientific Reports*, 13(1), 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>.
- Akbar Fitri, Himayanti, Rahman FF, Basnawi C, Hasrul N, & Sugianto I. 2022. Potential extract of Red algae (*Euchema spinosum*) on wound healing: literature review. *Makassar Dental Journal*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:254850623>.
- Akbar I. 2022. Literature Review: Pemanfaatan sumber daya kelautan untuk Sustainable Development Goals (SDGs). *Jurnal Sains Edukatika Indonesia (JSEI)*, 4(1), 17–22.
- Al Aboghaubar M, Alaidaroos B, Al-Hejin A, Bataweel N, & Hassoubah S. 2025. Antimicrobial activity of some bacteria isolated from a marine sponge in the Neom region, Saudi Arabia. *BMC Microbiology*, 25(1), 584. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04249-0>.
- Ali Alghamdi B, Al-Johani I, Al-Shamrani JM, Musamed Alshamrani H, Al-Otaibi BG, Almazmomi K, & Yusnoraini Yusof N. 2023. Antimicrobial resistance in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(4), 103604. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103604>.
- Alikhani MS, Nazari M, & Hatamkhani S. 2025. Enhancing antibiotic therapy through comprehensive pharmacokinetic/pharmacodynamic principles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1521091. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1521091>.
- Alipkina S, Kornienko E, Nalobin D, & Osmolovskiy A. 2021. Acute Toxicity, Immunotoxicity, and Allergenicity of Protease Complex Obtained from Micromycete *Sarocladium strictum*. *Pharmaceutics*, 13(10), 1660. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101660>.
- Alves A., & Kijjoa A. 2020. Marine-Derived Compounds with Potential Use as Cosmeceuticals and Nutricosmetics. *Molecules*, 25(5), 2536. <https://doi.org/10.3390/molecules25051223>.
- Ameen F, Alnadhari S, & Al-homaidan AA. 2021. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>.

- Ansari A, Zohra RR, Tarar OM, Qader SAU, & Aman A. 2018. Screening, purification, and characterization of thermostable, protease-resistant Bacteriocin active against *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *BMC Microbiology*, 18(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1337-y>.
- Anteneh YS, Yang Q, & Brown MH. 2021. Antimicrobial Activities of Marine Sponge-Associated Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e0123321. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01233-21>.
- Ashaolu TJ, Malik T, Soni R, Prieto MA, & Jafari SM. 2025. Extremophilic Microorganisms as a Source of Emerging Enzymes for the Food Industry: A Review. *Food Science and Nutrition*, 13(1), e4540. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4540>.
- Atre R, Sharma R, Obukhov AG, Saqib U, Umar S, Darwhekar GN, & Baig MS. 2024. An improved mouse model of sepsis based on intraperitoneal injections of the enriched culture of cecum slurry. *Life Sciences*, 345, 122584. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122584>.
- Balouri M, Sadiki M, & Ibnsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barnsley KK, & Ondrechen MJ. 2022. Enzyme active sites: Identification and prediction of function using computational chemistry. *Current Opinion in Structural Biology*, 74, 102384. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102384>
- Barzkar N. 2020. Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072>.
- Barzkar N, Sukhikh S, & Babich O. 2023. Study of marine microorganism metabolites: new resources for bioactive natural products. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1285902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285902>.
- Belay WY, Getachew M, Tegegne BA, Teffera ZH, Dagne A, Zeleke TK, Abebe RB, Gedif AA, Fenta A, Yirdaw G, Tilahun A, & Aschale Y. 2024. Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1444781. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1444781>.
- Beygmoradi A, & Homaei A. 2017. Marine microbes are a valuable resource for brand-new industrial biocatalysts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 131–152. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.013>.
- Bibi F, Yasir M, Al-Sofyani A, Naseer MI, & Azhar EI. 2020. Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.002>.

- Bowman L, Motamed R, Lee P, Aleem K, Berawala AS, Hayden KL, Bzik DJ, & Chattopadhyay D. 2020. Optimum pH in coupled enzyme assays. *BioTechniques*, 69(5), 327–330. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0126>.
- Brdová D, Ruml T, & Viktorová J. 2024. Mechanism of Staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 77, 101147. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2024.101147>.
- Brogan AP, & Rudner DZ. 2023. Regulation of peptidoglycan hydrolases: localization, abundance, and activity. *Current Opinion in Microbiology*, 72, 102279. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102279>.
- Cantonati M, Poikane S, Pringle CM, Stevens LE, Turak E, Heino J, Richardson JS, Bolpagni R, Borrini A, Cid N, Tvrtlíková M, Galassi DMP, Hájek M, Hawes I, Levkov Z, Naselli-Flores L, Saber AA, Cicco MDi, Fiasca B, & Znachor P. 2020. Characteristics, Main Impacts, and Stewardship of Natural and Artificial Freshwater Environments. *Water*, 12(1), 260. <https://doi.org/10.3390/w12010260>.
- Chen H, Zhang J, He Y, Lv Z, Liang Z, Chen J, Li P, Liu J, Yang H, Tao A, & Liu X. 2022. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. *Toxins*, 14(7), 464. <https://doi.org/10.3390/toxins14070464>.
- Chen J, Gu Z, Lai L, & Pei J. 2023. In silico protein function prediction: the rise of machine learning-based approaches. *Medical Review*, 3(6), 487–510. <https://doi.org/10.1515/mr-2023-0038>.
- Cheng TH, Ismail N, Kamaruding N, Saidin J, & Danish-Daniel M. 2020. Industrial enzymes-producing marine bacteria from marine resources. *Biotechnology Reports*, 27, e00482. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00482>.
- Corinaldesi C. 2015. New perspectives in benthic deep-sea microbial ecology. *Frontiers in Marine Science*, 2, 17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00017>.
- Culp E, & Wright GD. 2017. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 366–377. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.138>.
- Ćwilichowska N, Świdarska KW, Dobrzyń A, Drąg M, & Poręba M. 2022. Diagnostic and therapeutic potential of protease inhibition. *Molecular Aspects of Medicine*, 88, 101144. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101144>.
- Czerwi D. 2021. Guidelines for a Morphometric Analysis of Prokaryotic and Eukaryotic Cells by Scanning Electron Microscopy. *Cells*, 10(9), 2483. <https://doi.org/10.3390/cells10092483>.
- Dalmaso GZL, Ferreira D, & Vermelho AB. 2015. Marine extremophiles as a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1925–1965. <https://doi.org/10.3390/md13041925>.
- Oliveira Santos JV, Costa Júnior SD, de Souza JB, Coriolano DL, Silva WRC, Alves MHME, & Cavalcanti IMF. 2022. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. *Current Microbiology*, 79(6), 175. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02875-9>.

- Fanelli A, & Sullivan ML. 2023. Tools for protein structure prediction and for molecular docking applied to enzyme active site analysis: A case study using a BAHD hydroxycinnamoyltransferase. *Methods in Enzymology*, 683, 41–79. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.10.004>.
- Fergestad ME, Stamsås GA, Morales Angeles D, Salehian Z, Wasteson Y, & Kjos M. 2020. Penicillin-binding protein PBP2a provides variable levels of protection toward different β -laktams in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Microbiology Open*, 9(8), e1057. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1057>.
- Filippova TA, Masamrekh RA, Khudoklinova YY, Shumyantseva VV, & Kuzikov AV. 2024. The multifaceted role of proteases and modern analytical methods for the investigation of their catalytic activity. *Biochimie*, 222, 169–194. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.03.006>.
- Gaurav A, Bakht P, Saini M, Pandey S, & Pathania R. 2023. Role of bacterial pompa efflux in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel pompa efflux (pompa efflux (efflux pump)) inhibitors. *Microbiology*, 169(5), 001333. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001333>.
- Ghattavi S, & Homaei A. 2023. Marine enzymes: Classification and application in various industries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 230, 123136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123136>.
- Ghazi IM, & Cawley MJ. 2021. The science of pharmacokinetics: an overview and applications. In Remington (Twenty-third Edition), 207–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820007-0.00011-8>.
- Girma A. 2025. *Staphylococcus aureus*: Current perspectives on molecular pathogenesis and virulence. *Infection and Drug Resistance*, 18, 215–234. <https://doi.org/10.2147/IDR.S493308>.
- Glassman PM, & Muzykantov VR. 2019. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drug Delivery Systems. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), 570–580. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.257113>.
- Golding CG, Lamboo LL, Beniac DR, & Booth TF. 2016. The scanning electron microscope in microbiology and the diagnosis of infectious diseases. *Scientific Reports*, 6, 26516. <https://doi.org/10.1038/srep26516>.
- Grari O, Ezrari S, El Ydanouzi I, Benaissa E, Ben Lahlou Y, Lahmer M, Saddari A, Elouennass M, & Maleb A. 2025. A comprehensive review on biofilm-associated infections: Mechanisms, diagnostic challenges, and innovative therapeutic strategies. *The Microbe*, 8, 100436. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100436>.
- Hamid B, Bashir Z, Yattoo AM, Mohiddin F, Majeed N, Bansal M, Poczai P, Almalki WH, Sayyed RZ, Shati AA, & Alfaifi MY. 2022. Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—A Review. *Molecules*, 27(18), 5885. <https://doi.org/10.3390/molecules27185885>.

- Han R, Feng XQ, Vollmer W, Stoodley P, & Chen J. 2023. Deciphering the adaptation of bacterial cell wall mechanical integrity and turgor to different chemical or mechanical environments. *Journal of Colloid and Interface Science*, 640, 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.02.100>.
- Hartung T, Villoutreix B, Debré HR, & Marshall L. 2024. The (misleading) role of animal models in drug development. *Frontiers in Drug Discovery*, 4, 1355044. <https://doi.org/10.3389/fddsv.2024.1355044>.
- Hasanpour AH, Sepidarkish M, Mollalo A, Ardekani A, Almukhtar M, Mechaal A, Hosseini SR, Bayani M, Javanian M, & Rostami A. 2023. The global prevalence of *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* colonization in residents of elderly care centers: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 12(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01210-6>.
- Hassanzadeh S, Ganjloo S, Pourmand MR, Mashhadi R, & Ghazvini K. 2020. Epidemiology of pompa efflux (pompa efflux (efflux pump)) genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*: A systematic review. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103850. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103850>.
- Hassoun A, Linden PK, & Friedman B. 2017. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations: review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care*, 21(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1801-3>.
- Hickman DL, Johnson J, Vemulapalli TH, Crisler JR, & Shepherd R. 2017. Commonly Used Animal Models. In *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, 117–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4>.
- Hossain TJ. 2024. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>.
- Ishikawa F, Homma M, Tanabe G, & Uchihashi T. 2024. Protein degradation by a component of the chaperonin-linked protease ClpP. *Genes to Cells*, 29(9), 695–709. <https://doi.org/10.1111/gtc.13141>.
- Jain A, Jain R, & Jain S. 2020. Enzyme Assay: Qualitative and Quantitative. In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*, 39–51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_17.
- Jankoski PR, Correa APF, Berdanelli A, & Motta ASDA. 2021. Biological activity of bacteria isolated from wildland sediments collected from a conservation unit in the southern region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93(3), e20191269. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191269>.
- Jo J, Price-Whelan A, & Dietrich LEP. 2022. Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 593–607. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00692-2>.

- Jubeh B, Breijyeh Z, & Karaman R. 2020. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming. *Molecules*, 25(12), 2888. <https://doi.org/10.3390/molecules25122888>.
- Balenahalli Narasingappa R, & Vishnu Vyas G. 2024. Unveiling mechanisms of antimicrobial peptide: Actions beyond the membrane disruption. *Heliyon*, 10(19), e38079. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38079>.
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, & Thurnheer T. 2020. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>.
- Kaushik A, Kest H, Sood M, Steussy BW, Thieman C, & Gupta S. 2024. Biofilm-Producing *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections in Humans: Clinical Implications and Management. *Pathogens*, 13(1), 76. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010076>.
- Kochhar N, Kavya IK, Shrivastava S, Ghosh A, Rawat VS, Sodhi KK, & Kumar M. 2022. Perspectives on the microorganisms of extreme environments and their applications. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100134. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100134>.
- Kong EF, Johnson JK, & Jabra-Rizk MA. 2016. Community-Associated *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005837. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005837>.
- Kumar S, & Kumar S. 2019. Molecular Docking: A Structure-Based Approach for Drug Repurposing. In *In Silico Drug Design*, 161–189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00006-7>.
- Kumar Y, Singh H, & Patel CN. 2020. In silico prediction of potential inhibitors for the main protease of SARS-CoV-2 using molecular docking and dynamics simulation-based repurposing. *Journal of Infection and Public Health*, 13(9), 1210–1223. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.016>.
- Lee YJ. 2025. The Role of Bacterial Proteases from the Microbiome in Human Disease. *Cellular Microbiology*, 2025, 8860329. <https://doi.org/10.1155/cmi/8860329>.
- Lim D, & Strynadka NCJ. 2002. Structural basis for the β -laktam resistance of PBP2a from *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*, 9(11), 870–876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>.
- Liu A, Garrett S, Hong W, & Zhang J. 2024. *Staphylococcus aureus* Infections and Human Intestinal Microbiota. *Pathogens*, 13(4), 276. <https://doi.org/10.3390/pathogens13040276>.
- Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, & Shirliff ME. 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 101, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.028>.

- Maddiboyina B, Roy H, Ramaiah M, Sarvesh CN, Kosuru SH, Nakkala RK, & Nayak BS. 2023. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: Novel treatment approach breakthroughs. Bulletin of the National Research Centre, 47(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01072-3>.
- Marshall NC, Finlay BB, & Overall CM. 2017. Sharpening Host Defenses during Infection: Proteases Cut to the Chase. Molecular & Cellular Proteomics, 16(4), S161–S171. <https://doi.org/10.1074/mcp.O116.066456>.
- Martínez GM, Pire C, & Martínez-Espinosa RM. 2022. Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). Current Research in Microbial Sciences, 3, 100136. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100136>.
- Martinez MN, Mochel JP, & Toutain PL. 2025. Evolving value and validity of animal models in veterinary therapeutic research: Impact of scientific progress. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 210, 107111. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107111>.
- Maruthiah T, Immanuel G, & Palavesam A. 2017. Purification and Characterization of Halophilic Organic Solvent-Tolerant Protease from Marine *Bacillus* sp. APCMST-RS7 and Its Antioxidant Potentials. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 87(1), 207–216. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0603-0>.
- Metra BM, Guglielmo FF, Haleboua-DeMarzio DL, Civan JM, & Mitchell DG. 2022. Beyond the Liver Function Tests: A Radiologist's Guide to the Liver Blood Tests. Radiographics, 42(1), 125–142. <https://doi.org/10.1148/rq.210137>.
- Mougi A. 2024. pH Adaptation stabilizes bacterial communities. Npj Biodiversity, 3(1), 32. <https://doi.org/10.1038/s44185-024-00063-5>.
- Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, & Nandi SK. 2022. Role of animal models in biomedical research: a review. Laboratory Animal Research, 38(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s42826-022-00128-1>.
- Ngema SS, Khumalo SH, Ojo MC, Pooe OJ, Malilehe TS, Basson AK, & Madoroba E. 2023. Evaluation of Antimicrobial Activity by Marine *Nocardiopsis dassonvillei* against Foodborne *Listeria monocytogenes* and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Microorganisms, 11(10), 2539. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102539>.
- Nguyen H, Nguyen H, Nguyen P, Luu AN, Cantu DC, & Nguyen T. 2025. Identifying representative sequences of protein families using submodular optimization. Scientific Reports, 15(1), 1069. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-85165-1>.
- Norouzi H, Danesh A, Mohseni M, & Rabbani Khorasgani M. 2018. Marine Actinomycetes with Probiotic Potential and Bioactivity against Multidrug-resistant Bacteria. International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 7(1), 44–52. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.1.44>.

- Noskova Y, Nedashkovskaya O, & Balabanova L. 2025. Production, Purification, and Biochemical Characterization of a Novel ATP-Dependent Caseinolytic Protease from the Marine Bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296. *Microorganisms*, 13(2), 307. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020307>.
- O'Neill, J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance.
- Padhi AK, Janežič M, & Zhang KYJ. 2022. Molecular dynamics simulations: Principles, methods, and applications in protein conformational dynamics. In *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods*, 439–454. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90264-9.00026-X>.
- Pardo-Esté C, Cortés J, Castro-Severyn J, Pérez V, Henriquez-Aedo K, Cuadros F, Yañez C, Cuadros-Orellana S, Dorador C, Molina V, Eissler Y, Paquis P, Jeffrey WH, Pozo P, Pérez PA, & Hengst MB. 2024. Secondary metabolites with antimicrobial activity produced by thermophilic bacteria from a high-altitude hydrothermal system. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1477458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1477458>.
- Perera T, Sanjeeva KKA, & Herath KHIN. 2025. Promoting marine specialized bioactive metabolites against inflammation. In *Marine Specialized (Secondary) Metabolites and their Diverse Applications*, 173–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-29843-1.00007-0>.
- Pinzi L, & Rastelli G. 2019. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- Rachanamol RS, Lipton A, & Thankamani V. 2015. Molecular characterization and bioactivity profile of the tropical sponge-associated bacterium *Shewanella algae* VCDB. *Helgoland Marine Research*, 69(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s10152-014-0386-3>.
- Ramírez-Larrota JS, & Eckhard U. 2022. An Introduction to Bacterial Biofilms and Their Proteases and Their Roles in Host Infection and Immune Evasion. *Biomolecules*, 12(2), 306. <https://doi.org/10.3390/biom12020306>.
- Rampone S, Pagliarulo C, Marena C, Orsillo A, Iannaccone M, Trionfo C, Sateriale D, & Paolucci M. 2021. In silico analysis of the antimicrobial activity of phytochemicals: towards a technological breakthrough. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 200, 105820. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2020.105820>.
- Rao TE, Imchen M, & Kumavath R. 2017. Marine Enzymes: Production and Applications for Human Health. In *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications*, Part III, 149–163. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.006>.

- Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, & Elghonaimy AM. 2015. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal, and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research*, 175, 34
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002>.
- Rasquel-Oliveira FS, Ribeiro JM, Martelossi-Cebinelli G, Costa FB, Nakazato G, Casagrande R, & Verri WA. 2025. *Staphylococcus aureus* in Inflammation and Pain: Update on Pathologic Mechanisms. *Pathogens*, 14(2), 185.
<https://doi.org/10.3390/pathogens14020185>.
- Ratnikov BI, Cieplak P, Remacle AG, Nguyen E, & Smith JW. 2021. Quantitative profiling of protease specificity. *PLoS Computational Biology*, 17(2), e1008101.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008101>.
- Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, & Ashraf M. 2019. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.
- Riziotis IG, & Thornton JM. 2022. Capturing the geometry, function, and evolution of enzymes with 3D templates. *Protein Science*, 31(7), e4363.
<https://doi.org/10.1002/pro.4363>.
- Rodríguez-Melcón C, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Carballo J, & Capita R. 2022. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology*, 11(1), 46.
<https://doi.org/10.3390/biology11010046>.
- Romsuk J, Yasumoto S, Seki H, Fukushima EO, & Muranaka T. 2022. Identification of key amino acid residues toward improving the catalytic activity and substrate specificity of plant-derived cytochrome P450 monooxygenases CYP716A subfamily enzyme for triterpenoid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 955650.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.955650>.
- Rosado PC, Marques MM, & Justino GC. 2025. Targeting MRSA penicillin-binding protein 2a: structural insights, allosteric mechanisms, and the potential of adjuvant inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 239, 117048.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.117048>.
- Salehi M. 2024. Evaluating the industrial potential of naturally occurring proteases: A focus on kinetic and thermodynamic parameters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127782.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127782>.
- Santos JD, Vitorino I, Reyes F, Vicente F, & Lage OM. 2020. From ocean to medicine: Pharmaceutical applications of metabolites from marine bacteria. *Antibiotics*, 9(8), 455. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080455>.
- Santos LHS, Ferreira RS, & Caffarena ER. 2019. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Methods in Molecular Biology*, 2053, 13–34.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2.

- Sathe G, & Sapkota GP. 2023. Proteomic approaches advancing targeted protein degradation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 44(11), 786–801. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.08.007>.
- Sati H, Carrara E, Savoldi A, Hansen P, Garlasco J, Campagnaro E, Boccia S, Castillo-Polo JA, Magrini E, Garcia-Vello P, Wool E, Gigante V, Duffy E, Cassini A, Huttner B, Pardo PR, Naghavi M, Mirzayev F, Zignol M, & Umubyeyi Nyaruhirira A. 2025. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 25(9), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(25\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00118-5).
- Saubenova M, Rapoport A, & Yermekbay Z. 2025. Antimicrobial Peptides, Their Production, and Potential in the Fight Against Antibiotic-Resistant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1518577. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1518577>.
- Shaari SA, & Bakar NAA. 2023. MRSA: Rates, trends, and infection prevention & control practices. *International Journal of Infectious Diseases*, 134, S22. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.07.023>.
- Shalaby MAW, Dokla EME, Serya RAT, & Abouzid KAM. 2020. Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199, 112312. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112312>.
- Sharif S, & Yadav AK. 2025. Bacterial biofilm and its role in antibiotic resistance. *The Microbe*, 7, 100356. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100356>.
- Sharma N, Sharma N, Sharma S, Sharma P, & Devi B. 2023. Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms. In *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, 47–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00003-9>.
- Shoaib M, Aqib AI, Muzammil I, Majeed N, Bhutta ZA, Kulyar MFEA, Fatima M, Zaheer CNF, Muneer A, Murtaza M, Kashif M, Shafqat F, & Pu W. 2022. MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1067284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067284>.
- Shree P, Kant C, Kaur K, Niranjane J, & Kumar D. 2023. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance to antibiotics. *Medicine in Microecology*, 16, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2023.100084>.
- Solanki P, Putatunda C, Kumar A, Bhatia R, & Walia A. 2021. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, 11(10), 428. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>.
- Srinivasan R, Kannappan A, Shi C, & Lin X. 2021. Marine Bacterial Secondary Metabolites: A Treasure House for Structurally Unique and Effective Antimicrobial Compounds. *Marine Drugs*, 19(10), 530. <https://doi.org/10.3390/md19100530>.

- Stewart MP, Langer R, & Jensen KF. 2018. Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts. *Chemical Reviews*, 118(16), 7409–7531. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00678>.
- Sun R, Wu D, Chen P, & Zheng P. 2024. Cutting-edge computational approaches in enzyme design and activity enhancement. *Biochemical Engineering Journal*, 212, 109510. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109510>.
- Tripathi A, & Bankaitis VA. 2017. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. *Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications*, 2(1). <https://doi.org/10.16966/2575-0305.106>.
- Tripathi A, & Misra K. 2017. Molecular Docking: A structure-based drug design approach. *JSM Chemistry*, 5(3), 1042–1047.
- Tsouklidis N, Kumar R, Heindl SE, Soni R, & Khan S. 2020. Understanding the Fight Against Resistance: Hospital-Acquired *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* vs. Community-Acquired *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Cureus*, 12(6), e8867. <https://doi.org/10.7759/cureus.8867>.
- Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, Dhama K, Ripon MKH, Gajdács M, Sahibzada MUK, Hossain MJ, & Koirala N. 2021. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.
- Uehara Y. 2022. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). *Antibiotics*, 11(1), 86. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010086>.
- Uruén C, Chopo-Escuín G, Tommassen J, Mainar-Jaime RC, & Arenas J. 2021. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics*, 10(1), 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>.
- Venkataswamy GD, Harmsen D, D'Haese A, & Cornelissen ER. 2023. Membrane integrity monitoring on laboratory scale: Impact of test cell-induced damage on membrane selectivity. *Journal of Membrane Science*, 669, 121281. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2022.121281>.
- Wang S, Zhao Y, Breslawec AP, Liang T, Deng Z, Kuperman LL, & Yu Q. 2023. Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 63. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>.
- Wang Y, Zhang H, Zhong H, & Xue Z. 2021. Protein domain identification methods and online resources. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1145–1153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.041>.
- Wong F, & Amir A. 2019. Mechanics and Dynamics of Bacterial Cell Lysis. *Biophysical Journal*, 116(12), 2378–2389. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.04.040>.

- Xu S, Tan P, Tang Q, Wang T, Ding Y, Fu H, Zhang Y, Zhou C, Song M, Tang Q, Sun Z, & Ma X. 2023. Enhancing the stability of antimicrobial peptides: From design strategies to applications. *Chemical Engineering Journal*, 475, 145923. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145923>.
- Yadav AK, Espallat A, & Cava F. 2018. Bacterial Strategies to Preserve Cell Wall Integrity Against Environmental Threats. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2064. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02064>.
- Youn C, Archer NK, & Miller LS. 2020. Research Techniques Made Simple: Mouse Bacterial Skin Infection Models for Immunity Research. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(8), 1488-1497.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.04.012>.
- Zhang J, Conly J, McClure J, Wu K, Petri B, Barber D, Elsayed S, Armstrong G, & Zhang K. 2021. A Murine Skin Infection Model Capable of Differentiating the Dermatopathology of Community-Associated MRSA Strain USA300 from Other MRSA Strains. *Microorganisms*, 9(2), 287. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020287>.
- Zhao A, Sun J, & Liu Y. 2023. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1137947. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>.

BAB II

ISOLASI, SKRINING DAN IDENTIFIKASI BAKTERI LAUT PENGHASIL PROTEASE

2.1 Abstrak

Protease merupakan biokatalis penting dengan nilai ekonomi global yang signifikan untuk aplikasi dalam industri makanan, farmasi, detergen, tekstil, dan bioteknologi. Bakteri laut menjadi sumber protease potensial karena menghasilkan enzim dengan karakteristik unik seperti halotoleransi, termostabilitas, dan adaptasi terhadap kondisi ekstrem. **Tujuan:** untuk mengisolasi, memurnikan, mengidentifikasi, dan mengarakterisasi bakteri laut penghasil protease dari Pantai Losari, Makassar. **Metode:** mengisolasi bakteri dari sampel air laut dan sedimen dari empat titik yang dilanjutkan purifikasi bakteri metode pengenceran berseri pada media Marine Broth dan Nutrient Agar dan skrining aktivitas proteolitik menggunakan media Skim Milk Agar 1%. Selanjutnya Isolat terpilih dikarakterisasi secara morfologi, biokimia (SCA, TSIA, SIM, MR-VP, fermentasi karbohidrat), dan molekuler melalui sekuensing gen 16S rRNA serta analisis filogenetik. **Hasil: penelitian ini mengisolasi 25 isolat murni** (15 MB-SL dari sedimen dan 10 MB-WL dari air laut) yang seluruhnya merupakan bakteri Gram negatif. Isolat sedimen menunjukkan aktivitas proteolitik lebih tinggi (60%) dibandingkan air laut (20%). Dua isolat dengan aktivitas tertinggi adalah MB-SL5 ($14,1 \pm 0,9$ mm) yang diidentifikasi sebagai *Shewanella algae* (97,82% kemiripan) dengan karakteristik non-fermentatif, dan MB-SL6 ($13,2 \pm 0,8$ mm) yang diidentifikasi sebagai *Vibrio alginolyticus* (90,53% kemiripan) dengan karakteristik fermentatif. Pemodelan struktur protein ORF1 (*Shewanella algae*) dan ORF4 (*Vibrio alginolyticus*) menghasilkan model berkualitas tinggi (GMQE 0.64) yang divalidasi dengan baik melalui analisis Ramachandran dan MolProbity. *S. algae* menunjukkan identitas sekuens tinggi yang mencapai 76,19%, sementara *V. alginolyticus* menunjukkan identitas sekuens 88,10%. **Kesimpulan** penelitian ini terdapat perbedaan karakteristik metabolik antara *S. algae* yang nonfermentatif dengan respirasi anaerob dan *V. alginolyticus* yang fermentatif dengan fleksibilitas metabolik tinggi mengindikasikan partisi niche ekologis yang memungkinkan koeksistensi di lingkungan laut. Keragaman mekanisme produksi protease ini menunjukkan potensi aplikasi bioteknologi industri yang berbeda sesuai dengan karakteristik masing-masing isolat, khususnya untuk industri yang memerlukan enzim dengan stabilitas tinggi pada kondisi ekstrem.

Kata kunci: Bakteri laut, gen 16S rRNA, karakterisasi biokimia, Pantai Losari, protease, *Shewanella algae*, *Vibrio alginolyticus*

2.2 Pendahuluan

Protease merupakan katalis biologis pemecah protein yang mendominasi industri bioteknologi modern dengan pangsa pasar 60% dari total penjualan enzim industri global (Song et al., 2023). Enzim ini mengkatalisis pemecahan ikatan peptida menjadi peptida dan asam amino yang lebih sederhana sehingga diaplikasikan dalam industri pangan, pembuatan detergen, tekstil, farmasi, dan pengolahan limbah (Pamaya et al., 2018; Solanki et al., 2021). Perkembangan bioteknologi modern telah membuka peluang pemanfaatan mikroorganisme sebagai sumber protease yang memiliki peran penting dalam berbagai proses industri (Bond, 2019; Maurya et al., 2021). Meningkatnya permintaan protease telah mendorong eksplorasi sumber enzim baru yang memiliki karakteristik unggul dan efisiensi katalitik tinggi (Aruna et al., 2023; Ndochinwa et al., 2024; Shankar et al., 2021).

Industri enzim global mengalami pertumbuhan signifikan dengan nilai pasar yang terus meningkat (Siddikey et al., 2025). Ketergantungan pada sumber enzim konvensional dari tanaman dan hewan semakin menurun seiring perkembangan teknologi fermentasi mikroba (Zhang et al., 2019). Produksi enzim berbasis mikroba menawarkan keuntungan seperti proses lebih cepat, biaya lebih rendah, serta kemudahan manipulasi genetik untuk meningkatkan jumlah dan kualitas enzim (Singh et al., 2016). Hal ini mendorong intensifikasi penelitian mencari strain mikroba unggul penghasil enzim, termasuk dari habitat yang belum banyak dieksplorasi seperti lingkungan laut.

Lingkungan laut menyimpan potensi biodiversitas mikroorganisme yang sangat besar, tetapi belum tergali secara optimal (Dubey et al., 2024; Mao et al., 2024). Lautan Indonesia yang mencakup hampir 70% wilayah negara menyimpan kekayaan biota yang luar biasa besar, namun masih minim dimanfaatkan (Wuwung et al., 2024). Ekosistem perairan laut dengan kondisi lingkungan yang unik, seperti kandungan mineral, salinitas, pH, dan suhu yang bervariasi, menciptakan habitat bagi mikroorganisme dengan kemampuan metabolisme yang berbeda dari mikroorganisme pada umumnya (Dolbeth & Arenas, 2020). Bakteri laut yang hidup di ekosistem perairan memiliki kemampuan adaptasi luar biasa terhadap kondisi lingkungan yang unik, seperti salinitas tinggi, fluktuasi suhu, tekanan osmotik, dan ketersediaan nutrisi yang terbatas (Dubey et al., 2024; Mao et al., 2024). Kondisi ekstrem ini memicu bakteri laut untuk memproduksi enzim-enzim dengan karakteristik khusus, seperti halotoleran, termotabil, dan aktif pada pH ekstrem yang sangat dibutuhkan untuk aplikasi industri modern (Hutchins & Fu, 2017; Nur Jannah et al., 2021; Oliveira & Yusuff, 2024).

Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme yang paling banyak diteliti sebagai penghasil enzim komersial karena memiliki kemudahan kultivasi, laju pertumbuhan cepat, dan kemampuan produksi enzim yang tinggi (Hutchins & Fu, 2017). Dalam konteks pencarian sumber protease baru, bakteri laut menjadi objek yang menarik mengingat kemampuan adaptasinya terhadap lingkungan ekstrem dapat menghasilkan enzim dengan stabilitas dan efektivitas yang superior dibandingkan sumber konvensional (Shu & Huang, 2022). Karakteristik enzim yang dihasilkan oleh

mikroorganisme laut umumnya memiliki keunggulan adaptasi terhadap kondisi ekstrem (Salas-Bruggink et al., 2024). Protease dari bakteri laut dilaporkan memiliki aktivitas optimal pada rentang pH dan suhu yang luas, toleran terhadap konsentrasi garam tinggi, serta stabil dalam keberadaan berbagai ion logam dan inhibitor (Rathod et al., 2024). Sifat-sifat ini sangat dibutuhkan dalam aplikasi industri modern yang seringkali beroperasi pada kondisi non-optimal bagi enzim konvensional (Malik et al., 2024). Eksplorasi bakteri laut untuk tujuan ini masih terbuka luas dan menjanjikan penemuan-penemuan baru.

Pantai Losari Makassar merupakan salah satu kawasan pesisir yang memiliki aktivitas ekologi dan antropogenik tinggi. Pantai ini terletak di pesisir Kota Makassar, Sulawesi Selatan, dan memiliki karakteristik perairan yang unik dengan adanya pengaruh muara sungai, aktivitas pelabuhan, dan dinamika pasang surut yang menciptakan gradien lingkungan mikrohabitat beragam. Kondisi lingkungan seperti ini berpotensi menjadi habitat bagi bakteri laut dengan kemampuan metabolik yang beragam, termasuk bakteri penghasil protease (O'Connor et al., 2022; Sirajuddin et al., 2020). Eksplorasi mikroorganisme dari Pantai Losari tidak hanya penting dari aspek bioprospeksi, tetapi juga sebagai upaya inventarisasi kekayaan sumber daya genetik lokal Indonesia.

Karakteristik perairan Pantai Losari yang dipengaruhi oleh aktivitas antropogenik menghasilkan kondisi lingkungan dengan kandungan bahan organik yang tinggi, terutama protein dari sisa-sisa organisme laut dan limbah organik (Yusal et al., 2019). Kondisi ini mendorong proliferasi bakteri proteolitik yang mampu mendegradasi protein kompleks sebagai sumber nutrisi. Selain itu, variasi parameter fisiko-kimia seperti suhu, salinitas, dan pH di sepanjang kawasan Pantai Losari menciptakan tekanan selektif yang memungkinkan berkembangnya bakteri dengan kemampuan produksi protease yang adaptif dan efisien (Dey et al., 2021; Rahman et al., 2021).

Penelitian mengenai bakteri laut penghasil protease telah dilakukan di berbagai belahan dunia dengan hasil yang menunjukkan potensi besar. Berbagai genera bakteri laut, seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, dan *Alteromonas*, telah dilaporkan memiliki kemampuan menghasilkan protease dengan aktivitas yang bervariasi (Anand et al., 2025; Liu et al., 2025; Sultana & Joseph, 2024). Namun demikian, meskipun potensi biodiversitas laut Indonesia sangat tinggi, penelitian mengenai bakteri laut penghasil protease dari perairan lokal, khususnya Pantai Losari Makassar, masih sangat terbatas. Padahal, penemuan isolat bakteri indigenous dari perairan Indonesia dapat memberikan nilai tambah berupa enzim dengan karakteristik adaptif terhadap kondisi tropis dan memiliki keunikan genetik tersendiri (Mochd, 2014; Trikurniadewi, 2025). Selain itu, pemanfaatan sumber daya genetik lokal sejalan dengan upaya menjaga kedaulatan bioteknologi nasional dan pengembangan ekonomi berbasis bioteknologi kelautan (Ahmad et al., 2025; Trikurniadewi, 2025).

Keunggulan protease dari bakteri laut dibandingkan sumber lainnya terletak pada stabilitas dan aktivitasnya pada kondisi ekstrem yang sesuai dengan kebutuhan industri modern (Barzkar, 2020; Cheng et al., 2020). Industri detergen, misalnya, membutuhkan enzim yang aktif pada suhu tinggi dan pH alkalis, sementara industri farmasi memerlukan enzim dengan spesifisitas substrat yang tinggi dan stabilitas

dalam berbagai pelarut (Maurer, 2024). Protease dari bakteri laut memiliki potensi untuk memenuhi persyaratan aplikasi industri tersebut dengan modifikasi minimal, sehingga mengurangi biaya produksi dan meningkatkan efisiensi proses (Maurer, 2024; Sebastian et al., 2025).

Tahapan isolasi, purifikasi, dan skrining merupakan tahapan krusial dalam penemuan bakteri penghasil protease (Kotb et al., 2023; Rakaz et al., 2021). Isolasi bertujuan memisahkan bakteri dari sampel lingkungan dan mendapatkan kultur campuran, purifikasi dilakukan untuk memperoleh kultur murni (Patra et al., 2020), sedangkan skrining berfungsi menyeleksi isolat yang memiliki aktivitas proteolitik tinggi melalui uji kualitatif dan kuantitatif (Thongsongkaew et al., 2025). Keberhasilan tahapan-tahapan ini sangat menentukan kualitas isolat yang diperoleh dan potensinya untuk pengembangan lebih lanjut.

Teknik isolasi dan identifikasi bakteri dari lingkungan laut telah berkembang pesat dengan berbagai metode yang semakin spesifik dan akurat. Metode kultivasi menggunakan media selektif memungkinkan isolasi bakteri dengan kemampuan metabolik tertentu, sementara teknik skrining kualitatif dan kuantitatif memfasilitasi seleksi isolat dengan aktivitas enzim yang tinggi (Masi et al., 2021). Pendekatan metodologis yang sistematis dan terstandarisasi dalam isolasi dan skrining bakteri laut sangat penting untuk memastikan reproduktibilitas dan validitas hasil penelitian (McConn et al., 2024; Saelens & Houf, 2022). Penggunaan media selektif yang mengandung substrat protein, kondisi inkubasi yang sesuai dengan habitat asli bakteri, serta metode deteksi aktivitas proteolitik yang sensitif dan spesifik akan meningkatkan peluang keberhasilan dalam memperoleh isolat unggul (Bonnet et al., 2020; Chauhan et al., 2020). Kemajuan dalam teknik molekuler juga memungkinkan identifikasi bakteri hingga tingkat spesies dengan akurasi tinggi, memberikan informasi penting untuk klasifikasi dan karakterisasi lebih lanjut (Franco-Duarte et al., 2019).

Identifikasi bakteri penghasil protease merupakan tahap kritis yang menentukan keberhasilan pengembangan produk enzim lebih lanjut (Dubey et al., 2024; Kotb et al., 2023). Proses identifikasi tidak hanya mencakup penentuan taksonomi bakteri, tetapi juga karakterisasi awal mengenai kemampuan produksi enzim, kondisi pertumbuhan optimal, serta sifat-sifat fisiologis lainnya (Chauhan & Jindal, 2020; Sharma et al., 2023). Informasi komprehensif yang diperoleh dari tahap identifikasi menjadi basis data penting untuk tahap penelitian selanjutnya seperti optimasi media, kondisi fermentasi, dan purifikasi enzim (Thallapureddy et al., 2024).

Pengembangan database bakteri laut Indonesia yang memiliki aktivitas proteolitik akan memberikan kontribusi signifikan bagi kemajuan bioteknologi nasional. Database ini dapat menjadi rujukan bagi peneliti lain dalam mengembangkan aplikasi protease untuk berbagai keperluan industri. Kontribusi penelitian ini dalam konteks pengembangan bioekonomi Indonesia sangat strategis. Pemanfaatan sumber daya hayati laut untuk menghasilkan produk bernilai tambah tinggi sejalan dengan arah kebijakan pembangunan nasional yang menitikberatkan pada ekonomi berbasis pengetahuan dan inovasi.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini difokuskan pada isolasi, purifikasi, skrining, dan identifikasi bakteri laut penghasil protease dari Pantai Losari

Makassar. Kegiatan penelitian mencakup pengambilan sampel dari perairan laut, isolasi dan purifikasi bakteri, skrining aktivitas proteolitik, serta karakterisasi isolat positif melalui pendekatan morfologi, biokimia, dan molekuler. Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan isolat-isolat bakteri laut potensial yang dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai sumber protease untuk kepentingan industri dan mendukung pengembangan bioteknologi kelautan di Indonesia.

2.3 Metode penelitian

2.3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-Agustus 2023 di Laboratorium Bakteriologi, Program Studi Laboratorium Medis, Politeknik Muhammadiyah Makassar.

2.3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf (Hirayama HVE-50), inkubator (Mettler), Laminar Air Flow (LAF) (Esco Airstream), mikropipet (Eppendorf), tip mikropipet, pipet tetes, pengaduk magnetik (IKA), pH meter (Hanna Instruments), neraca analitik (Sartorius), vortex mixer (Thermo Scientific), binokuler (Olympus), kaca objek dan kaca penutup, colony counter (Stuart), alat-alat gelas (Pyrex), lemari pendingin dengan suhu 4°C dan -20°, *kotak pendingin*, thermal cycler (Applied Biosystems Veriti atau Bio-Rad T100), tabung PCR 0,2 mL/ PCR strip tubes, microcentrifuge (Eppendorf 5424), heating block (Thermo Scientific), perangkat elektroforesis gel agarose : chamber (Bio-Rad Sub-Cell GT), power supply (Bio-Rad PowerPac Basic), dan comb, UV transilluminator (Gel Doc™ XR+ System Bio-Rad), UV-Vis (Shimadzu UV-1800).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel air laut dan sedimen dari Pantai Losari, Kota Makassar, Zobell Marine Agar/ZMA (Difco), air laut steril, Marine Broth (Merck), Skim Milk Agar/SMA (Oxoid), Nutrient Agar (Difco/Oxoid), Marine Agar (Difco), NaCl (Merck), akuades steril, etanol 70% dan 96% (Merck), HCl 0,1 N (Merck), NaOH 0,1 N (Merck), crystal violet (Merck), larutan iodine/ Lugol (Merck), safranin (Merck), minyak imersi (Merck), H₂O₂ 3% (Merck); tetrametil-p-fenilendiamin (Merck/Sigma-Aldrich); media SIM/Sulfide Indole Motility (Difco/Oxoid); reagen Kovac's (Merck); MR-VP broth (Difco), reagen methyl red (Merck), reagen Barritt A dan B (Merck); media Simmon's Citrate Agar (Difco/Oxoid); media fermentasi gula-gula glukosa, sukrosa, laktosa, manitol (Difco/Oxoid), serta uji TSI/Triples Sugar Iron (Difco/Oxoid); kit DNA ekstraksi (Qiagen DNeasy Blood), primer untuk gen 16S rRNA yaitu primer universal 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' dan primer universal 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', PCR master mix (GoTaq Green Master Mix Promega, MyTaq Red Mix Biorline) agarose untuk elektroforesis 0,8-1,5% (Vivantis atau Bio-Rad); buffer elektroforesis TAE atau TBE (1st BASE); loading dye 6× (Thermo Scientific atau Promega); DNA ladder/marker 100 bp atau 1 kb (Thermo Scientific GeneRuler atau Promega); EtBr/ethidium bromide (Bio-Rad) atau SYBR Safe (Invitrogen); kit purifikasi PCR (Qiagen QIAquick

PCR Purification Kit); produk PCR yang sudah dipurifikasi untuk sequencing; primer sequencing, serta tabung untuk pengiriman sampel sequencing ke Genetika Science.

2.4 Prosedur penelitian

2.4.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah digunakan untuk mensterilkan medium, akuades, dan alat-alat nongelas dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan untuk alat-alat gelas disterilisasi menggunakan sterilisasi panas kering dalam oven pada suhu 160-170°C selama 1-2 jam.

2.4.2 Pembuatan media

Zobell Marine Agar (ZMA). Media Zobell Marine Agar (ZMA) dengan komposisi yaitu pepton 5 g, yeast extract 1 g, agar 15 g, dan air laut steril 1000 mL. Homogenisasi larutan dengan pengaduk magnetik, lalu disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari autoklaf. Media ditunggu dingin sekitar 45°C lalu dituang ke cawan petri. Media dibiarkan hingga memadat dengan sempurna sebelum digunakan (Kabense et al., 2019).

Media Marine Broth (MB). Media Marine Broth (MB) yang mengandung pepton 5 g, yeast extract 1 g, dan air laut steril 1000 mL. Homogenisasi larutan dengan pengaduk magnetik, lalu disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari autoklaf dan media ditunggu hingga dingin sebelum digunakan (Kabense et al., 2019; Syafrizal et al., 2020).

Media Skim Milk Agar (SMA). Media Skim Milk Agar (SMA) dengan komposisi skim milk powder 10-20 g, pepton 5 g, yeast extract 1 g, agar 15 g, dan air laut steril 1000 mL. Homogenisasi larutan dengan pengaduk magnetik, lalu disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari autoklaf. Setelah medium dingin sekitar 45°C kemudian dituang ke cawan petri. Media dibiarkan hingga memadat dengan sempurna sebelum digunakan (Masi et al., 2021).

Media Nutrien Agar (NA). Media Nutrien Agar (NA) 28 g kemudian dilarutkan dengan 1 L air laut steril. Homogenisasi larutan dengan pengaduk magnetik, lalu disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit. Setelah steril, media diambil dari autoklaf. Media ditunggu dingin sekitar 45°C lalu dituang ke cawan petri. Media dibiarkan hingga memadat dengan sempurna sebelum digunakan (Kabense et al., 2019).

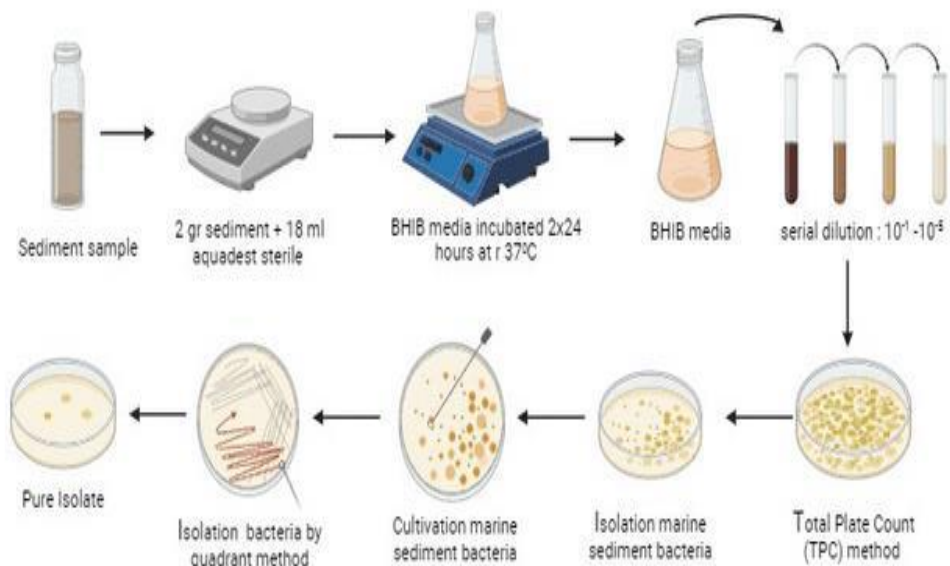
2.4.3 Pengambilan sampel, isolasi dan purifikasi bakteri

Pengambilan sampel. Titik pengambilan sampel ditentukan pada lokasi yang sama dengan jarak dari pantai ± 2 km dan kedalaman air 5 mtr. Sampel air laut sebanyak 600 mL dimasukkan ke dalam botol yang telah disterilkan. Sampel sedimen sebanyak ± 20 g diambil dan dimasukkan ke dalam botol steril terpisah, kemudian ditutup rapat sebelum dibawa ke permukaan. Kedua sampel disimpan

dalam *kotak pendingin* untuk dibawa ke laboratorium. Setelah tiba di laboratorium, semua sampel disimpan dalam refrigerator ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) sebelum digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya.

Preparasi sampel. Sampel air laut dipipet sebanyak 2 m kemudian ditambahkan 18 mL air laut steril. Sampel sedimen sebanyak 2 g ditambahkan 18 mL air laut steril, dihomogenkan, lalu didiamkan sampai mengendap. Masing-masing suspensi dipipet sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan pada media marine broth (MB) sebanyak 75 mL. Suspensi diinkubasi dengan shaker inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C (Henson et al., 2016; Yao et al., 2023).

Isolasi bakteri. Suspensi bakteri yang telah diinkubasi selama 48 jam diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL air laut steril. Setelah itu, dilakukan pengenceran berseri 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Dari masing-masing pengenceran dipipet untuk ditumbuhkan pada media Nutrient Agar (NA) menggunakan metode metode cawan tuang, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3×24 jam (Bhuyan et al., 2023; Ishaq et al., 2024; Yao et al., 2023). Untuk memahami proses isolasi, skrining, dan purifikasi bakteri dari masing-masing sampel dapat dilihat pada skema kerja pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Tahapan isolasi dan purifikasi bakteri laut

(sumber: <https://www.rjptonline.org/AbstractView.aspx?PID=2024-17-6-67>)

Purifikasi bakteri. Koloni yang tumbuh setelah masa inkubasi selesai pada masing-masing cawan petri diamati. Koloni yang memiliki bentuk dan warna yang sama kemudian dipindahkan ke media Zobell Marine Agar (ZMA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk mendapatkan koloni tunggal. Apabila masih ditemukan koloni yang lain, maka pemisahan kembali dilakukan. Setelah koloni

tunggal diperoleh, dimurnikan dengan metode gores. Perlakuan ini dilakukan berulang hingga diperoleh isolat murni (Joint et al., 2010; Rodrigues & Carvalho, 2022; Govindarajan et al., 2024; Sakami, 2019).

2.4.4 Skrining isolat bakteri laut penghasil protease

Koloni tunggal yang telah diperoleh selanjutnya ditotol pada media Skim Milk Agar (SMA) dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37°C dan 40°C. Indikasi bahwa isolat bakteri yang mendegradasi protein (skim milk agar) dengan baik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Isolat murni yang memiliki zona bening selanjutnya dilakukan uji indeks proteolitik (IP). Isolat yang memiliki indeks proteolitik (IP) yang tinggi dipilih untuk produksi enzim dan identifikasi mikroba (El-Hassayeb & Abdel Aziz, 2016; Masi et al., 2021).

2.4.5 Karakterisasi isolat bakteri

Identifikasi morfologi bakteri secara makroskopis dan makroskopis.

Pengamatan makroskopis meliputi warna koloni, bentuk koloni, permukaan koloni, dan pertumbuhan koloni pada bakteri yang telah diisolasi dengan metode penanaman langsung (Sousa et al., 2013). Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 48 jam dan terus dilakukan sampai diperoleh koloni murni. Masing-masing koloni murni kemudian dipindahkan ke dalam medium Nutrien Agar (NA) miring sebagai kultur biakan stok dan biakan kerja.

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram untuk melihat bentuk sel dan membedakan bakteri Gram positif dan negatif. Prosedur pewarnaan diawali dengan fiksasi bakteri pada kaca objek yang telah disterilkan menggunakan NaCl fisiologis 0,9%. Pewarnaan dilakukan secara bertahap menggunakan karbol kristal ungu (Gram A) selama 5 menit, larutan lugol (Gram B) selama 45-60 detik, alkohol 96% (Gram C) selama 15-30 detik, dan safranin (Gram D) selama 1-2 menit. Setiap tahap pewarnaan diikuti dengan pembilasan akuades dan pengeringan, kemudian preparat diamati di bawah mikroskop (Islam & Roy, 2018; Mondal & Thomas, 2022).

Identifikasi karakterisasi bakteri secara biokimia. Bakteri dikarakterisasi dengan melakukan beberapa pengujian biokimia. Uji biokimia dilakukan untuk menentukan spesies dari isolate bakteri dengan menggunakan metode Bergey Manual of Determinative Bacteriology. Uji ini mencakup:

Uji Simon Citrat Agar (SCA). Uji sitrat dilakukan dengan mengambil 1 isolat bakteri terpilih, digores pada permukaan media SCA, dan ditusukkan ke bagian tengah media hingga ke dasar tabung reaksi. Media diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji positif jika sedang berubah dari warna hijau menjadi warna biru karena terjadi peningkatan pH. Perubahan warna hijau menjadi biru menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Ogodo et al., 2022).

Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA). Isolat bakteri digores pada permukaan media agar miring TSIA dan juga ditusukkan tegak lurus ditengah media, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditandai dengan adanya perubahan warna media TSIA dari warna cokelat tua menjadi orange atau kuning. Terbentuknya H₂S dapat diamati dengan terbentuknya warna kehitaman pada bekas goresan sedangkan pembentukan gas dapat diamati terbentuknya rongga pada bagian bawah agar (Lehman, 2000).

Uji Sulfur Indol Motility (SIM). Isolat bakteri sebanyak 1 ose diinokulasikan pada media Sulfur Indol Motility (SIM) dengan cara menusukkan hingga setengah media pada tabung reaksi, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditunjukkan dengan adanya jejak pergerakan bakteri (Patricia et al., 2011).

Uji Metil Red-Voges Proskauer (MR-VP). Isolat bakteri sebanyak 1 ose diinokulasikan pada media Metil Red-Voges Proskauer (MR-VP) kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada pengujian Metil Red, inokulum ditetesi dengan 2 tetes metal-red, jika terbentuk cincin ungu-merah maka menunjukkan reaksi positif. Pada pengujian Voges-Proskauer, inokulum ditetesi dengan reagen barit A dan barit B, jika terbentuk cincin ungu-merah, menunjukkan reaksi positif dengan adanya 2,3-butanadiol sebagai produk utama hasil fermentasi karbohidrat dari bakteri (Patricia et al., 2011).

Fermentasi karbohidrat. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose biakan bakteri ke dalam media yang terdiri dari glukosa, sukrosa, manitol dan laktosa kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif ditandai dengan berubahnya media menjadi warna kuning karena terdapat asam pada hasil fermentasi karbohidrat (Reine, 2012).

Identifikasi bakteri secara molekuler. Isolat bakteri dengan aktivitas protease tertinggi diidentifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA (Amin et al., 2025; Mahmoud et al., 2021). Isolasi DNA dilakukan dengan memasukkan 1 ose biakan bakteri ke medium LB cair, ditambahkan 20 µL proteinase K, kemudian diinkubasi pada 70°C selama 1-3 jam. Selanjutnya ditambahkan 200 µL dapar GB, diinkubasi kembali pada 70°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µL etanol 96%, dan disentrifugasi. Campuran dipindahkan ke kolom CB 3, disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian dilakukan pencucian dengan dapar GB dan dapar PW hingga membran kering. DNA dielusi dengan 50-200 µL dapar TE dan disimpan pada 4°C. Amplifikasi DNA menggunakan PCR dengan volume total 25 µL (1,5 µL DNA, 12,5 µL 2x Taq Plus Mix PCR, 1 µL primer maju 63F, 1 µL primer mundur 1387R, dan 9 µL Nuclease Free Water). Siklus PCR: denaturasi awal 95°C/5 menit, 35 siklus (denaturasi 95°C/30 detik, penempelan 50°C/30 detik, polimerisasi 72°C/1 menit), dan polimerisasi akhir 72°C/10 menit. Hasil amplifikasi dideteksi dengan elektroforesis 2% gel agarosa menggunakan marker DNA ladder 100 bp (120 volt, 60 menit), kemudian disekuensing. Urutan basa disatukan menggunakan DNA Baser

versi 4 dan dianalisis dengan BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk identifikasi berdasarkan GenBank. Pohon filogenetik dibuat menggunakan MEGA 11.

Pemodelan struktur protein bakteri penghasil protease menggunakan SWISS Model. Pemodelan protein dari hasil sekuensing isolat bakteri *Shewanella algae* dan *Vibrio alginolyticus* melibatkan serangkaian langkah sistematis yang mengubah informasi sekuens asam amino menjadi struktur tiga dimensi yang dapat diprediksi. Langkah pertama adalah analisis sekuens dan kontrol kualitas, di mana hasil sekuensing DNA perlu melalui tahap preprocessing yang mencakup pembersihan data dari kontaminan, adapter, dan sekuens berkualitas rendah menggunakan perangkat lunak Bionet, kemudian dilanjutkan dengan verifikasi kualitas dengan mengecek skor kualitas base calling (Phred score) untuk memastikan akurasi data sekuensing. Setelah data bersih, dilakukan penentuan open reading frame (ORF) menggunakan ORF Finder NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) untuk menemukan sekuens pengkode protein potensial, yang kemudian ditranslasi dari sekuens nukleotida menjadi sekuens asam amino menggunakan kode genetik bakteri. Langkah kedua adalah anotasi dan identifikasi protein, yang dimulai dengan analisis BLAST menggunakan BLASTP di database NCBI untuk mengidentifikasi fungsi protein melalui pencarian homologi, diikuti dengan analisis domain protein menggunakan InterProScan atau Pfam untuk memahami struktur fungsional protein target. Langkah ketiga adalah pemodelan struktur tiga dimensi protein menggunakan metode homologi atau komparatif melalui platform SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), di mana sistem akan melakukan pencarian struktur template yang memiliki homologi tinggi dengan protein target, kemudian secara otomatis membangun model berdasarkan alignment dengan template tersebut, dan menghasilkan evaluasi kualitas model menggunakan parameter seperti QMEAN, Ramachandran plot, dan GMQE score. Langkah terakhir adalah validasi dan visualisasi struktur, yang meliputi pemeriksaan stereokimia menggunakan MolProbity untuk memastikan kualitas geometri struktur.

2.5 Hasil dan pembahasan

2.5.1 Pengambilan sampel dan gambaran lokasi penelitian

Penentuan titik pengambilan sampel dilakukan menggunakan Global Positioning System (GPS) pada jarak sekitar 2 km dari pesisir Pantai Losari, Makassar, Sulawesi Selatan dengan kedalaman 5 meter. Penggunaan GPS bertujuan memastikan akurasi koordinat geografis dan memungkinkan replikasi pengambilan sampel di lokasi yang sama pada penelitian selanjutnya. Sampel air dan sedimen disimpan ke botol sampel steril, hasil pengukuran suhu sampel berkisar $\pm 30^{\circ}\text{C}$ - 31°C menggunakan termometer digital dan pH 5-7 diukur menggunakan pH meter, disimpan dalam kotak pendingin, lalu dianalisis di Laboratorium Bakteriologi Politeknik Muhammadiyah Makassar. Sampel ditumbuhkan dalam media pertumbuhan dan disubkultur berulang hingga diperoleh isolat murni, memastikan bakteri spesifik tanpa kontaminasi mikroorganisme lain (Gupta, 2023).

Empat titik pengambilan sampel (**Gambar 2.2**) memiliki karakteristik lingkungan yang berbeda dan saling melengkapi dalam eksplorasi bakteri laut penghasil protease. Titik pertama (-5,133688 LU, 119,344029 BT) dengan suhu 31°C dan pH 5 merepresentasikan kondisi ekstrem yang mendukung pertumbuhan bakteri termofilik dan acidofilik penghasil enzim termostabil dengan karakteristik ganda termostabilitas dan stabilitas pada kondisi asam yang memberikan nilai aplikasi tinggi dalam berbagai industri (Arya et al., 2021; Cheng et al., 2020; Danilova & Sharipova, 2020; Dhanak & Xiros, 2016; Kabir & Ju 2023; Lund et al., 2020; Meghwanshi et al., 2020; Xu et al., 2025).



Gambar 2. 2 Titik lokasi pengambilan sampel

Titik kedua (-5,134539 LU, 119,402609 BT) dengan suhu 30°C dan pH 7 menciptakan lingkungan optimal karena bakteri neutrofilik tumbuh ideal pada pH netral dan suhu moderat, memungkinkan berbagai spesies berkembang menghasilkan variasi enzim beragam yang lebih mudah dikultivasi dan dioptimalkan untuk produksi enzim skala industri dengan stabilitas tinggi dan proses purifikasi yang lebih mudah (Abrar Hamza, 2017; Brauer et al., 2023; Danilova & Sharipova, 2020; Jin & Kirk, 2018; Kabir & Ju, 2023; Wang et al., 2021).

Titik ketiga (-5,135378 LU, 119,402702 BT) dengan suhu 31°C dan pH 6 menunjukkan kondisi transisi yang menawarkan keseimbangan antara stabilitas lingkungan dan potensi menghasilkan enzim dengan fleksibilitas aktivitas pada rentang pH luas, di mana bakteri yang tumbuh lebih mudah dikultivasi dibandingkan bakteri acidofilik ekstrem namun tetap menghasilkan enzim dengan karakteristik menarik untuk aplikasi bioteknologi yang memerlukan enzim dengan fleksibilitas tinggi (Gado et al., 2025; Kabir & Ju, 2023; Lund et al., 2020; Pati et al., 2023; Qiu et al., 2022).

Titik keempat atau titik kontrol (-5,123931 LU, 119,344029 BT) dengan suhu 30°C dan pH 6 berperan krusial sebagai baseline untuk mengevaluasi kondisi pertumbuhan bakteri pada ketiga titik penelitian lainnya, memberikan referensi pembandingan untuk menganalisis bagaimana variasi kondisi lingkungan

memengaruhi pertumbuhan dan produksi protease, serta menyediakan data kondisi kultivasi yang dapat dijadikan standar produksi protease skala laboratorium atau industri dengan stabilitas dan aktivitas konsisten (Dubey et al., 2024; Knapp et al., 2025; Maurya et al., 2021; Sultana & Joseph, 2024).

Perbedaan suhu dan pH pada keempat titik lokasi penelitian memiliki makna sangat signifikan dalam eksplorasi bakteri laut penghasil protease dengan karakteristik beragam. Variasi kondisi lingkungan dirancang strategis untuk mengidentifikasi bakteri dengan kemampuan adaptasi berbeda, di mana titik pertama dengan suhu 31°C dan pH 5 merepresentasikan kondisi ekstrem yang hanya dapat ditoleransi bakteri acidofilik dan termofilik, sementara titik kedua dengan suhu 30°C dan pH 7 memberikan kondisi optimal untuk pertumbuhan bakteri neutrofilik yang umum di lingkungan laut. Gradasi ini menciptakan spektrum seleksi yang memungkinkan isolasi bakteri penghasil protease dengan karakteristik stabilitas berbeda, mulai dari enzim sangat stabil pada kondisi asam dan suhu tinggi hingga enzim optimal pada kondisi netral dan suhu moderat.

Makna biologis dari perbedaan ini terletak pada prinsip adaptasi mikroorganisme terhadap tekanan lingkungan berbeda, di mana titik ketiga dengan suhu 31°C dan pH 6 menciptakan kondisi transisi yang memungkinkan pertumbuhan bakteri dengan fleksibilitas adaptasi tinggi dan berpotensi menghasilkan protease dengan rentang aktivitas luas, sementara titik kontrol dengan suhu 30°C dan pH 6 memberikan baseline stabil untuk perbandingan dan evaluasi objektif. Variasi ini juga mencerminkan kondisi natural di berbagai habitat laut, mulai dari area terpengaruh aktivitas vulkanik atau pencemaran yang menghasilkan pH rendah, hingga perairan normal dengan pH netral.

Perspektif bioteknologi dan aplikasi industri, perbedaan kondisi ini memiliki implikasi sangat penting untuk pengembangan protease dengan karakteristik sesuai aplikasi spesifik (Sujitha & Shanthi, 2023). Enzim dari titik pertama dengan kondisi ekstrem berpotensi memiliki stabilitas luar biasa pada kondisi asam dan suhu tinggi yang sangat berharga untuk industri yang beroperasi pada kondisi keras, enzim dari titik kedua dapat memberikan aktivitas tinggi dan stabil untuk aplikasi umum, enzim dari titik ketiga menjadi kandidat menarik untuk aplikasi yang memerlukan fleksibilitas operasional, sementara enzim dari titik kontrol memberikan standar kualitas yang dapat diandalkan untuk produksi komersial yang konsisten (Chapman et al., 2018; Majeed et al., 2024; Zhang & Han, 2024).

Secara keseluruhan, strategi pengambilan sampel dengan variasi suhu dan pH mencerminkan pendekatan komprehensif dalam bioprospecting bakteri laut penghasil protease (Chapman et al., 2018; Rodrigues & Carvalho, 2022; Sultana & Joseph, 2024). Perbedaan kondisi ini tidak hanya memungkinkan identifikasi bakteri dengan kemampuan adaptasi beragam, tetapi juga membuka peluang untuk menemukan enzim dengan karakteristik novel yang dapat memenuhi kebutuhan industri berbeda (Brown & Babbitt, 2014; Rodrigues & Carvalho, 2022). Makna fundamental dari variasi ini adalah penciptaan perpustakaan biologis bakteri dan enzim dengan spektrum karakteristik luas, mulai dari yang sangat stabil pada kondisi ekstrem hingga optimal pada kondisi normal, memberikan fleksibilitas tinggi dalam

pengembangan produk enzim untuk berbagai aplikasi bioteknologi serta pemahaman lebih mendalam tentang bagaimana faktor lingkungan memengaruhi evolusi dan adaptasi bakteri laut beserta potensi mereka dalam menghasilkan biomolekul dengan nilai komersial tinggi (Fasim et al., 2021; Robinson, 2015).

2.5.2 Hasil Isolasi, skrining dan pemurnian bakteri laut

Proses persiapan sampel melibatkan dua pendekatan berbeda sesuai karakteristik sampel. Sampel air laut diproses melalui pengenceran langsung, sementara bakteri dari sedimen diekstraksi melalui homogenisasi. Selanjutnya, kedua suspensi diperkaya menggunakan media marine broth (MB) untuk menciptakan lingkungan selektif bagi pertumbuhan bakteri target. Penggunaan media pengaya ini menjadi tahap kritis yang memungkinkan adaptasi dan perkembangbiakan mikroorganisme dalam kondisi kultur. Tahapan preparasi sampel dilakukan dengan kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan pengadukan konstan menggunakan shaker inkubator. Pertumbuhan mikroba dalam media Marine Broth (MB) diamati dan dicatat setelah inkubasi 24 dan 48 jam. Hasil pengamatan karakteristik pertumbuhan disajikan dalam **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 menyajikan data pengamatan awal, sampel air laut (AL 1-4) dan sedimen laut (SED 1-4) memiliki media berwarna kuning jernih tanpa kekeruhan, yang merupakan karakteristik alami media Marine Broth, menandakan mikroba masih dalam tahap adaptasi awal. Setelah inkubasi 24 jam, seluruh sampel menunjukkan perubahan konsisten dengan media berubah menjadi keruh disertai endapan di dasar tabung, mengindikasikan peningkatan jumlah sel mikroorganisme secara eksponensial pada fase logaritmik di mana bakteri aktif membelah diri dan memanfaatkan nutrisi untuk metabolisme dan pertumbuhan. Keseragaman hasil pada keempat replikasi menunjukkan kondisi inkubasi konsisten dan metode kultur memadai.

Pada pengamatan jam ke-48, kondisi kultur tidak menunjukkan perubahan visual signifikan dibandingkan jam ke-24, mengindikasikan kultur telah memasuki fase stasioner di mana laju pertumbuhan sel melambat dan mencapai keseimbangan dengan laju kematian sel akibat nutrisi mulai berkurang dan akumulasi metabolit toksik. Hasil kultur dari sampel air laut dan sedimen laut tidak menunjukkan perbedaan visual signifikan, menampilkan pola pertumbuhan identik yang mengindikasikan mikroorganisme memiliki karakteristik pertumbuhan serupa meskipun habitat aslinya berbeda. Hasil pengamatan mengkonfirmasi media Marine Broth efektif untuk menumbuhkan mikroorganisme laut dengan reproduktibilitas baik, dan stabilitas kondisi kultur dari jam ke-24 hingga ke-48 menandakan waktu optimal untuk isolasi dan karakterisasi lebih lanjut.

Tabel 2.1 Karakteristik pertumbuhan bakteri laut pada Media Marine Broth (MB)

Sampel	Waktu (Jam)	Fase Pertumbuhan	Hasil Pengamatan
Air laut (AL1-AL4)	0	Kondisi awal	Pertumbuhan bakteri ditandai dengan media berwarna kuning
	24	Fase adaptasi	Pertumbuhan bakteri ditandai dengan media berwarna kuning keruh, endapan di dasar tabung
	48	Fase stasioner	Pertumbuhan bakteri ditandai dengan media berwarna kuning keruh, endapan di dasar tabung
Sedimen Laut (SED1-SED2)	0	Kondisi awal	Pertumbuhan bakteri ditandai dengan media berwarna kuning
	24	Fase adaptasi	Pertumbuhan bakteri ditandai dengan media berwarna kuning keruh, endapan di dasar tabung
	48	Fase stasioner	Pertumbuhan bakteri ditandai dengan media berwarna kuning keruh, endapan di dasar tabung

Keterangan:

AL1- AL4 : Sampel air laut pada titik lokasi 1-4

SED1-SED4 : Sampel sedimen pada titik lokasi 1-4

Suspensi bakteri hasil pengkayaan dalam media Marine Broth (MB) diencerkan secara berseri untuk memperoleh kultur murni dan koloni terpisah. Proses pengenceran menghasilkan rentang konsentrasi sel mikroba dari 10^{-1} hingga 10^{-5} . Sejumlah volume sama dari setiap tingkat pengenceran kemudian dikultur menggunakan metode cawan tuang pada media Nutrien Agar (NA). Teknik ini bertujuan memisahkan sel-sel bakteri sehingga dapat berkembang menjadi koloni individu yang dapat diamati dan dihitung. Seluruh kultur padat diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Tabel 2.2 menyajikan hasil tahap isolasi yang menunjukkan perkembangan koloni pada setiap tingkat pengenceran. Tabel tersebut menyajikan hasil pengamatan detail terhadap koloni bakteri yang diisolasi dari dua kategori sampel lingkungan laut berbeda, yaitu air laut dan sedimen laut. Penelitian ini dirancang dengan pendekatan mikrobiologis standar yang melibatkan teknik pengenceran serial untuk memperoleh pemahaman mendalam tentang kepadatan, distribusi, dan karakteristik morfologi bakteri yang hidup dalam ekosistem laut (Ogodo et al., 2022).

Tabel 2.2 Profil pertumbuhan dan karakteristik morfologi isolat bakteri laut

Sumber isolat	Kode Sampel (n)	Jumlah Koloni Ambang Batas (TBUD)	Pengenceran Optimal	Morfologi Koloni	Fenotif
Air laut	AL1-AL4	$10^{-1} - 10^{-2}$	$10^{-3} - 10^{-5}$	Datar, pigmen kuning	Pergerakan menyebar, menutupi permukaan media
Sedimen Tipe A	SED1-SED2	$10^{-1} - 10^{-2}$	$10^{-3} - 10^{-5}$	Datar, pigmen kuning	Pergerakan menyebar, menutupi permukaan media
Sedimen Tipe B	SED3-SED4	$10^{-1} - 10^{-3}$	$10^{-4} - 10^{-5}$	Datar, pigmen kuning	Pergerakan menyebar, menutupi permukaan media

Keterangan :

TBUD : Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Tipe A : Densitas sel standar

Tipe B : Densitas sel tinggi

Pengenceran serial dilakukan dari 10^{-1} hingga 10^{-5} , dengan pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} menghasilkan jumlah koloni optimal 30-300 per cawan petri (Heuser et al., 2023; Natsir et al., 2024; Reynolds, 2005). Koloni menunjukkan morfologi seragam berbentuk datar dengan pigmentasi kuning, mengindikasikan dominasi bakteri penghasil pigmen karotenoid atau flavin sebagai mekanisme perlindungan terhadap stres oksidatif dan radiasi ultraviolet (Agarwal et al., 2023; Jeong et al., 2022; Ren et al., 2024).

Sampel air laut (AL1-AL4) menunjukkan kondisi TBUD pada pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} , mengindikasikan kepadatan bakteri $10^6 - 10^8$ CFU/ml yang khas untuk lingkungan laut kaya nutrisi (Bellali et al., 2020; Liu et al., 2025; Pinhassi et al., 2022; Porter et al., 2025). Sampel sedimen Tipe A (SED1-SED2) menunjukkan pola serupa dengan air laut, sedangkan sedimen Tipe B (SED3-SED4) memiliki kepadatan bakteri lebih tinggi dengan kondisi TBUD bertahan hingga pengenceran 10^{-3} , mengindikasikan area sedimen lebih kaya bahan organik (Kuznetsova & Timerbaev, 2022; Tuit & Wait, 2020).

Dominasi bakteri dengan bentuk koloni datar dan warna kuning mengindikasikan adaptasi terhadap kondisi lingkungan laut, dimana bentuk datar mengoptimalkan akses nutrisi di permukaan substrat dan pigmentasi kuning berfungsi sebagai perlindungan terhadap radiasi UV atau stres oksidatif (Caudal et al., 2024; Chen et al., 2024). Keseragaman morfologi mengindikasikan dominasi spesies closely related atau tekanan selektif kuat dalam lingkungan laut (Chauhan and Jindal, 2020; Menéndez-Serra et al., 2024). Kepadatan bakteri tinggi pada kondisi TBUD menunjukkan produktivitas tinggi ekosistem laut yang disebabkan oleh ketersediaan nutrisi melimpah (Dai et al., 2025; Hou et al., 2019). Variabilitas pola pertumbuhan

antara sampel mencerminkan heterogenitas spasial dalam komunitas mikroba laut (Gibbons & Gilbert, 2015; Rong et al., 2023), sementara viabilitas tinggi setelah pengenceran menunjukkan adaptabilitas dan fleksibilitas fisiologis bakteri dalam lingkungan laut dinamis (Godwin & Cotner, 2015; Xu et al., 2024).

Koloni dengan bentuk dan warna sama dipindahkan ke media marine agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk mendapatkan koloni tunggal. Pemisahan dilakukan berulang menggunakan metode gores hingga diperoleh isolat murni. **Tabel 2.3** menyajikan profil isolat bakteri laut dari Pantai Losari yang diperoleh dari dua sumber berbeda. Isolasi dari air laut (AL1-AL4) menghasilkan 10 isolat (MB-WL1-MB-WL10), sedangkan sedimen (SED1-SED4) menghasilkan 15 isolat (MB-SL1-MB-SL15). Produktivitas isolasi dari sedimen lebih tinggi (1-6 isolat per sampel) dibandingkan air laut (1-4 isolat per sampel), mengindikasikan kepadatan dan diversitas bakteri lebih tinggi pada sedimen. Karakterisasi selanjutnya dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil protease, dimana isolat dengan indeks proteolitik tertinggi akan diidentifikasi lebih lanjut secara makroskopis, mikroskopis, biokimia, dan molekuler.

Tabel 2.3 Profil isolat bakteri laut berdasarkan sumber sampel

Sumber sampel		Kode sampel
Air laut	AL1	MB-WL1-2
	AL2	MB-WL3
	AL3	MB-WL4-6
	AL4	MB-WL7-10
Sedimen	SED1	MB-SL1
	SED2	MB-SL2-5
	SED3	MB-SL6--9
	SED4	MB-SL10-15

Keterangan:

MB-WL : Kode sampel dari air laut Pantai Losari

MB-SL : Kode sampel sedimen Pantai Losari

AL1-4 : Sumber sampel air laut dari titik lokasi 1-4

SED1-4: Sumber sampel sedimen dari titik lokasi 1-4

2.5.3 Hasil skrining isolat bakteri penghasil protease

Tahap selanjutnya melibatkan proses skrining isolat yang dapat menghasilkan protease pada masing-masing isolat murni menggunakan media skim milk konsentrasi 1% (**Gambar 2.3**) sebagai substrat. Hasil skrining bakteri penghasil protease ditampilkan pada **Tabel 2.4**.

Tabel 2.4 Pengukuran zona proteolitik isolat bakteri laut

Kode Isolat	Diameter zona bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	Indeks proteolitik (mm)
MB-SL1	13.64 ± 0.77	1.10 ± 0.06	12.4 ± 0.7
MB-SL2	13.31 ± 0.55	1.10 ± 0.05	12.1 ± 0.5
MB-SL3	12.21 ± 0.44	1.10 ± 0.04	11.1 ± 0.4
MB-SL4	14.08 ± 0.66	1.10 ± 0.05	12.8 ± 0.6
MB-SL5	15.51 ± 0.99	1.10 ± 0.06	14.1 ± 0.9
MB-SL6	14.52 ± 0.88	1.10 ± 0.06	13.2 ± 0.8
MB-SL7	13.42 ± 0.55	1.10 ± 0.05	12.2 ± 0.5
MB-SL8	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-SL9	13.31 ± 0.66	1.10 ± 0.05	12.1 ± 0.6
MB-SL10	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-SL11	12.21 ± 0.44	1.10 ± 0.04	11.1 ± 0.4
MB-SL12	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-SL13	14.03 ± 0.77	1.10 ± 0.06	12.75 ± 0.7
MB-SL14	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-SL15	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-WL1	11.11 ± 0.22	1.10 ± 0.02	10.10 ± 0.2
MB-WL2	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-WL3	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-WL4	12.13 ± 0.55	1.10 ± 0.05	11.03 ± 0.5
MB-WL5	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-WL6	0 ± 0	1.10 ± 0.05	0 ± 0
MB-WL7	0 ± 0	1.13 ± 0.06	0 ± 0
MB-WL8	0 ± 0	1.41 ± 0.16	0 ± 0
MB-WL9	0 ± 0	1.22 ± 0.06	0 ± 0
MB-WL10	0 ± 0	1.30 ± 0.55	0 ± 0

**Gambar 2.3. Skrining protease pada media skim milk 1%**

Hasil skrining aktivitas proteolitik menunjukkan dari 15 isolat MB-SL, 9 isolat (60%) menunjukkan aktivitas proteolitik positif dengan indeks berkisar $11,1 \pm 0,4$ mm hingga $14,1 \pm 0,9$ mm, sementara 6 isolat (40%) tidak aktif. Isolat MB-SL5 menunjukkan aktivitas tertinggi ($14,1 \pm 0,9$ mm), diikuti MB-SL6 ($13,2 \pm 0,8$ mm), MB-SL4 ($12,8 \pm 0,6$ mm), dan MB-SL13 ($12,75 \pm 0,7$ mm).

Standar deviasi yang kecil ($0,4-0,9$ mm) mengindikasikan reproduktibilitas tinggi dan karakteristik proteolitik yang stabil (Oliveira-Silva et al., 2020). Prevalensi tinggi

bakteri proteolitik konsisten dengan peran protease dalam siklus nitrogen laut melalui remineralisasi nitrogen organik kompleks menjadi bentuk lebih sederhana (Pajares & Ramos, 2019; Devault et al., 2025). Isolat nonproteolitik kemungkinan memiliki strategi nutrisi berbeda seperti spesialisasi pada substrat nonprotein atau produksi protease intraseluler (Kang et al., 2020; Yagami et al., 2019).

Isolat dengan aktivitas tinggi, khususnya MB-SL5 dan MB-SL6, memiliki potensi untuk aplikasi industri deterjen, pangan, farmasi, bioremediasi, dan industri kulit (Matkawala et al., 2021; Philipps-Wiemann, 2018; Jamal et al., 2025). Protease bakteri laut umumnya memiliki karakteristik adaptif seperti halotoleransi, adaptasi suhu rendah, dan stabilitas pH ekstrem (Mokashe et al., 2018; Anand et al., 2025). Sementara itu, isolat MB-WL menunjukkan tingkat keberhasilan lebih rendah dengan 2 dari 10 isolat (20%) aktif proteolitik, yaitu MB-WL1 ($10,10 \pm 0,2$ mm) dan MB-WL4 ($11,03 \pm 0,5$ mm), mengindikasikan pengaruh signifikan sumber isolasi terhadap kapasitas proteolitik mikroorganisme laut.

2.5.4 Hasil identifikas secara makroskopis dan mikroskopis

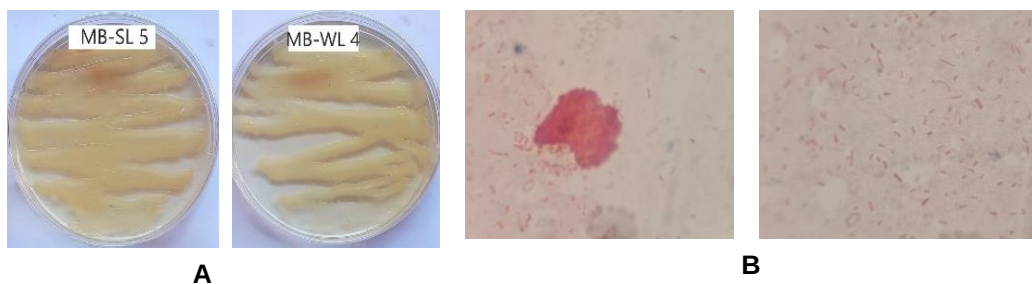
Koloni tunggal dimurnikan dengan metode gores berulang hingga diperoleh isolat murni yang karakteristiknya disajikan pada **Tabel 2.5**. Isolasi bakteri dilakukan menggunakan media Nutrient Agar (NA) yang dimodifikasi dengan air laut steril untuk menyediakan nutrisi lengkap dan mempertahankan kondisi osmotik yang sesuai bagi bakteri halofilik dari lingkungan laut (Bonnet et al., 2020; Patra et al., 2020; Štanfel et al., 2022). Purifikasi dilakukan dengan metode gores berulang pada media Marine Agar pada suhu 37°C selama 48 jam untuk memastikan kultur murni tunggal (Lagier et al., 2015).

Inkubasi pada suhu 37°C dipilih karena optimal bagi bakteri mesofil untuk memaksimalkan aktivitas metabolisme (López-García et al., 2015; Poli et al., 2017), merupakan standar internasional untuk komparabilitas hasil (Hossain, 2024), serta relevan secara klinis pada suhu fisiologis manusia (Rayalu et al., 2024). Modifikasi media NA dengan air laut steril mengakomodasi kebutuhan bakteri halofilik dalam mempertahankan konsentrasi ion esensial bagi stabilitas membran sel dan fungsi enzimatis (De Servi et al., 2020; Yu et al., 2025).

Seluruh isolat (100%, n=25) merupakan bakteri Gram negatif, konsisten dengan prevalensi di ekosistem laut karena adaptabilitas struktur dinding selnya terhadap kondisi osmotik tinggi dan fluktuasi salinitas. Bentuk koloni terdiri dari sirkular sempurna (56%, n=14) dan tepi bergelombang (44%, n=11) yang mencerminkan perbedaan motilitas dan kemampuan membentuk biofilm. Tekstur permukaan terbagi menjadi seperti lilin (40%, n=10) dan halus (60%, n=15), dengan elevasi datar (68%, n=17) dan cembung (32%, n=8) yang berkaitan dengan laju pertumbuhan. Dominasi pigmentasi kekuningan mengindikasikan produksi karotenoid sebagai mekanisme fotoproteksi terhadap radiasi UV dan stres oksidatif. Karakteristik morfologi menunjukkan lima klaster fenotipik berbeda, mencerminkan keragaman genetik dan strategi adaptasi ekologis komunitas bakteri laut yang diisolasi.

Tabel 2.5 Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri laut

Kode isolat	Jumlah (n)	Bentuk Koloni	Warna	Tekstur Permukaan	Elevasi	Pewarnaan Gram
MB-SL1 MB-SL5 MB-SL6 MB-WL6 MB-WL7	5	Tepi bergelombang Datar	Krem - krem kuning	Seperti lilin	Datar	Negatif
MB-SL3 MB-SL4 MB-SL7 MB-SL9 MB-WL5	5	Sirkular	Krem putih - krem kuning	Seperti lilin	Datar	Negatif
MB-SL2 MB-SL8 MB-SL12 MB-SL13 MB-SL14 MB-WL1 MB-WL4 MB-WL9 MB-WL10	9	Sirkular	Krem - krem putih	Halus/licin	Cembung	Negatif
MB-SL10 MB-SL11 MB-SL15 MB-WL8	4	Tepi bergelombang	Krem - krem putih	Halus/licin	Cembung	Negatif
MB-WL2 MB-WL3	2	Tepi bergelombang	Krem putih	Halus/licin	Datar	Negatif

**Gambar 2.4 Hasil Pengamatan (A) Koloni bakteri dan (B) Pengecatan Gram**

Konsistensi warna kuning pada lebih dari setengah isolat mengindikasikan dominasi kelompok taksonomi penghasil pigmen kuning seperti *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, atau *Vibrio*, tekanan selektif lingkungan yang menguntungkan bakteri berpigmen sebagai perlindungan terhadap radiasi UV atau stres oksidatif,

serta kemungkinan transfer gen horizontal yang menyebarkan sifat pigmentasi anterspesies.

Tekstur permukaan menunjukkan 40% isolat bertekstur seperti lilin dan 60% halus. Tekstur seperti lilin berkorelasi dengan produksi lipid permukaan yang berfungsi sebagai barier terhadap dehidrasi dan senyawa toksik, memberikan keuntungan adaptif pada kondisi salinitas tinggi untuk mempertahankan homeostasis osmotik. Profil elevasi koloni menunjukkan 68% datar dan 32% cembung, mencerminkan laju pertumbuhan dan aktivitas metabolik bakteri dimana koloni cembung mengindikasikan pertumbuhan vigorous, sementara koloni datar mengindikasikan penyebaran lateral dominan.

Keragaman morfologi mengindikasikan diversitas fungsional dalam komunitas bakteri laut dengan niche ekologis dan peran metabolik beragam. Dari perspektif bioteknologi, isolat berpigmen kuning menunjukkan potensi sebagai sumber karotenoid alami bernilai tinggi dalam industri farmasi, kosmetik, dan pangan, sedangkan variasi tekstur permukaan mengindikasikan kapasitas produksi eksopolisakarida atau biosurfaktan untuk aplikasi bioteknologi lingkungan dan industri.

2.5.5 Hasil karakterisasi biokimia

Berdasarkan hasil skrining, isolat dengan indeks proteolitik tinggi yaitu MB-SL5 dan MB-SL6 dilanjutkan dengan karakterisasi biokimia dan molekular. DNA diekstraksi dari kedua isolat untuk identifikasi lebih lanjut, dengan hasil uji biokimia disajikan pada **Tabel 2.7**.

Tabel 2.6 Hasil karasteristik biokimia

Uji Biokimia		<i>Shewanella algae</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Simmons Citrate Agar (SCA)		Negatif	Positif
TSIA	Slant/ Butt	Alkaline (K/Red) / Alkaline (K/Red)	Alkaline (K/Red) / Acid (A/Yellow)
	Produksi Gas/H ₂ S	Negatif (-) / Positif (+++)	Positif (+) / Negatif (-)
	Sulfide	Positif (+++)	Negatif (-)
SIM	Indole	Negatif (-)	Positif (+)
	Motility	Positif (+)	Positif (+++)
MR		Neg (-)	Neg (-)
VP		Pos (+)	Pos (+)
Glukosa		Neg (-)	Pos (+)
Sukrosa		Neg (-)	Pos (+)
Mannitol		Neg (-)	Pos (+)
Laktosa		Neg (-)	Neg (-)

Hasil karakterisasi biokimia pada **Tabel 2.6** menunjukkan perbedaan profil metabolik antara *Shewanella algae* dan *Vibrio alginolyticus* yang mencerminkan strategi adaptasi dan niche ekologis berbeda.

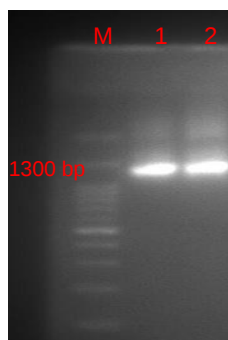
Uji Simmons Citrate Agar (SCA) menunjukkan *S. algae* negatif dan *V. alginolyticus* positif, mengindikasikan perbedaan kemampuan memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon tunggal dan fleksibilitas metabolik *V. alginolyticus* yang lebih besar pada kondisi oligotrofik. Pada uji TSIA, *S. algae* menunjukkan reaksi alkaline/alkaline tanpa fermentasi karbohidrat, tidak memproduksi gas, tetapi menghasilkan H₂S tinggi (+++), sementara *V. alginolyticus* menampilkan reaksi alkaline/acid dengan fermentasi glukosa, memproduksi gas, tetapi tanpa H₂S. Produksi H₂S tinggi oleh *S. algae* mengindikasikan aktivitas metabolisme sulfur yang relevan dengan peran dalam siklus sulfur di sedimen laut.

Uji SIM menunjukkan *S. algae* memproduksi sulfida tinggi (+++), indol negatif, dan motilitas positif, sedangkan *V. alginolyticus* tidak memproduksi sulfida, indol positif, dan motilitas sangat tinggi (+++). Uji MR dan VP menunjukkan pola sama (MR negatif, VP positif), mengindikasikan fermentasi butanediol. Uji fermentasi karbohidrat menunjukkan *S. algae* tidak dapat memfermentasi glukosa, sukrosa, dan mannitol, sementara *V. alginolyticus* dapat memfermentasi ketiganya, menunjukkan versatilitas metabolik lebih tinggi.

Profil biokimia *S. algae* konsisten dengan karakteristik genus *Shewanella* sebagai bakteri respirasi anaerobik fakultatif dengan kemampuan reduksi berbagai senyawa, sedangkan *V. alginolyticus* mencerminkan karakteristik genus *Vibrio* sebagai bakteri heterotrof oportunistik dengan metabolisme fermentatif aktif. Perbedaan ini mencerminkan partisi niche ekologis dimana *S. algae* lebih dominan di lingkungan anoksik seperti sedimen laut dalam, sedangkan *V. alginolyticus* lebih adaptif di kolom air dengan ketersediaan oksigen dan fluktuasi nutrisi organik lebih tinggi.

2.5.6 Hasil karakterisasi secara molekular

Berdasarkan hasil skrining, isolat dengan indeks proteolitik tinggi yaitu MB-SL5 dan MB-SL6 dilanjutkan dengan karakterisasi molekular. DNA diekstraksi dan dikonfirmasi kualitasnya melalui rasio A260/A280 (1,8–2,0) serta elektroforesis gel agarosa. Amplifikasi gen 16S rDNA dilakukan menggunakan PCR, menghasilkan produk berukuran 1.300 bp (Gambar 2.5) yang dianalisis pada gel agarosa 1%. Sekuens 16S rDNA selanjutnya dibandingkan dengan database GenBank untuk identifikasi spesies.



Keterangan:

M: Marker (1300 bp)

1 : Isolat MB-SL5

2 : Isolat MB-SL6

Gambar 2.5 Hasil amplifikasi PCR isolat bakteri protease

Berdasarkan hasil analisis BLAST, isolat MB-SL5 menunjukkan identitas sekuens 98% (1.255/1.283 nukleotida) dengan *Shewanella algae* strain DW01 (NR_117770.1) score 2.246 bits, dan E-value 0,0 yang didukung oleh nilai bootstrap sangat tinggi (99%), mengindikasikan hubungan filogenetik yang kuat dan kepercayaan statistik tinggi terhadap identifikasi spesies ini (**Lampiran 1**). Meskipun terdapat perbedaan 2,18% nukleotida (28 posisi berbeda) yang mencerminkan varian geografis lokal dengan adaptasi spesifik terhadap kondisi lingkungan Pantai Losari, keberadaan wilayah sangat terkonservasi pada posisi 299-658 dengan kecocokan 100% menunjukkan domain fungsional kritis yang stabil dan merupakan karakteristik penting untuk fungsi biologis protein. Isolat ini merupakan dokumentasi molekuler pertama *S. algae* dari perairan Makassar dengan aktivitas proteolitik tertinggi ($14,1 \pm 0,9$ mm) di antara semua isolat yang diperoleh, memberikan kontribusi penting untuk database keragaman genetik *Shewanella* di Indonesia. Keberadaan basa ambigu pada posisi strategis (119, 238-239, 779, 838-839) mengindikasikan variabilitas genetik yang mungkin terkait dengan mekanisme adaptasi lokal terhadap kondisi lingkungan laut tropis, menjadikan isolat ini kandidat potensial untuk pengembangan biokatalis protease dengan karakteristik unik yang sesuai untuk aplikasi bioteknologi industri.

Dalam taksonomi molekuler mikrobiologi, batas umum identifikasi spesies adalah minimal 97% identitas gen 16S rRNA, sehingga hasil 98% memberikan kepercayaan kuat bahwa sampel adalah *S. algae* atau spesies yang sangat dekat secara filogenetik. *S. algae* merupakan bakteri Gram negatif yang umumnya ditemukan di lingkungan laut dan air payau dengan kemampuan respirasi anaerob.

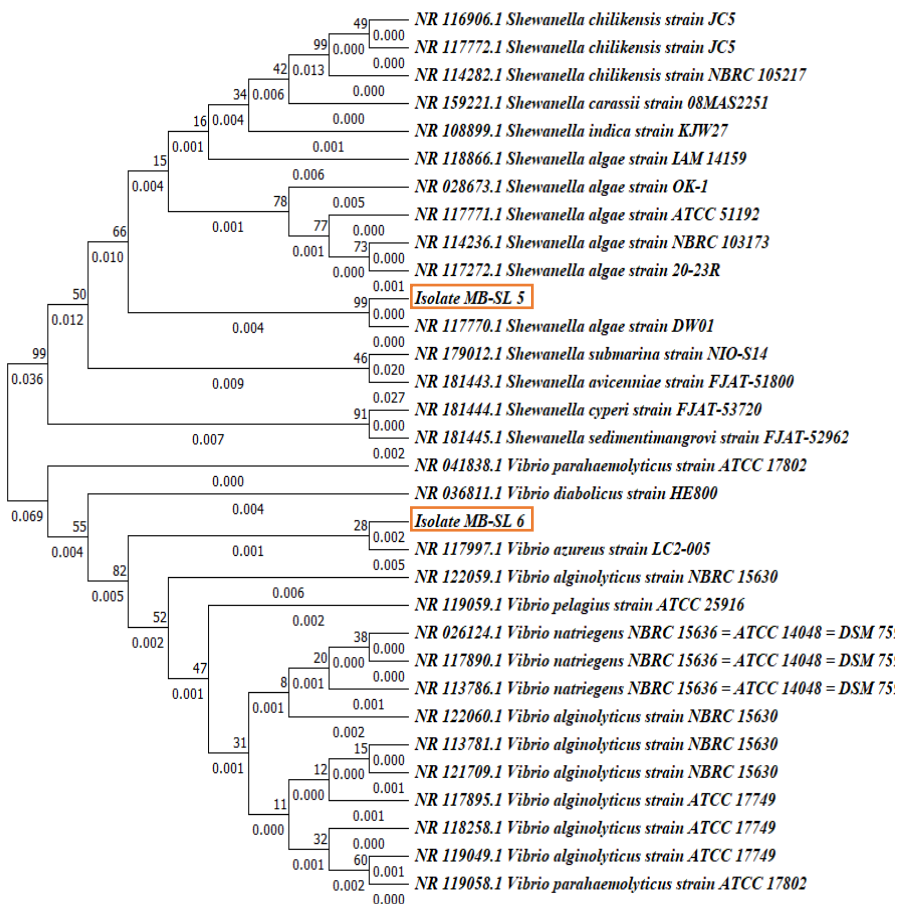
Isolat MB-SL6 menunjukkan identitas sekuens yang jauh lebih rendah yaitu 91% (1.185/1.309 nukleotida) dengan *Vibrio alginolyticus* strain NBRC 15630 (NR_122050.1) (1.185/1.309 nukleotida identik), score 1.853 bits, dan E-value 0,0 yang berada di bawah threshold standar 97% untuk identifikasi spesies definitif, didukung oleh nilai bootstrap sedang (52%) yang mencerminkan kompleksitas filogenetik dan divergensi evolusioner cepat dalam genus *Vibrio* (**Lampiran 2**). Perbedaan substansial 9,47% (124 nukleotida) disertai dengan 25 gaps (1%) mengindikasikan variasi struktural signifikan yang kemungkinan besar menunjukkan bahwa MB-SL6 adalah kandidat strain baru, subspecies, atau bahkan spesies yang

belum terkarakterisasi dalam kompleks *V. alginolyticus* yang memerlukan konfirmasi lebih lanjut melalui whole genome sequencing, multilocus sequence analysis (MLSA), dan average nucleotide identity (ANI) untuk memvalidasi status taksonominya. Banyaknya basa ambigu (K, W, M, R, Y, S) terutama pada region awal-tengah sekuens mengindikasikan heterogenitas genetik tinggi dan kompleksitas evolusioner yang mencerminkan kemungkinan adanya rekombinasi genetik, horizontal gene transfer, atau adaptasi lokal yang ekstensif terhadap kondisi lingkungan sedimen Pantai Losari. Kombinasi karakteristik aktivitas proteolitik tinggi ($13,2 \pm 0,8$ mm) dan keunikan genetik yang signifikan, isolat ini memiliki potensi sangat tinggi sebagai penemuan taksonomi baru yang dapat memberikan kontribusi signifikan terhadap pemahaman diversitas dan evolusi genus *Vibrio* di perairan tropis Indonesia, menjadikannya kandidat menarik untuk penelitian bioprospeksi enzim dan pengembangan bioteknologi kelautan dengan aplikasi potensial dalam industri yang memerlukan protease dengan stabilitas dan aktivitas spesifik.

Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan MEGA 11 dengan metode kemungkinan maksimum. Analisis pengelompokan menunjukkan MB-SL5 dalam genus *Shewanella* berada dalam kelompok dengan dukungan bootstrap tertinggi (99%), menunjukkan tingkat kepercayaan statistik sangat kuat dan diferensiasi evolusioner yang jelas. Posisi MB-SL5 menunjukkan status taksonomi sangat stabil dan terdefinisi dengan baik dalam genus *Shewanella*. Hasil BLAST yang menunjukkan kemiripan tinggi dengan *S. algae* strain DW01 dikonfirmasi oleh posisi filogenetik MB-SL5 dalam pohon yang terletak dalam kelompok yang sama dengan nilai bootstrap 99%, memberikan dukungan statistik sangat kuat dari 1.000 ulangan bootstrap. Kedekatan filogenetik antara MB-SL5 dan strain DW01 menunjukkan keduanya mungkin adalah galur berbeda dari spesies yang sama atau sangat berkaitan erat dalam kompleks *S. algae*.

Isolat MB-SL6 dalam genus *Vibrio* menunjukkan pola distribusi dukungan statistik berbeda. Kelompok *V. alginolyticus* membentuk kelompok dengan dukungan bootstrap 52%, menunjukkan dukungan sedang tetapi dapat diterima untuk identifikasi. Sebagian besar cabang internal dalam genus *Vibrio* menunjukkan dukungan bootstrap rendah (8%–47%), mengindikasikan ketidakpastian tinggi dalam hubungan filogenetik. Dominasi kelompok bootstrap rendah hingga sedang menunjukkan genus *Vibrio* telah mengalami radiasi adaptif cepat yang tidak memberikan cukup waktu untuk akumulasi mutasi menghasilkan sinyal filogenetik kuat.

Dari perspektif metodologis, pendekatan filogenetik berbasis gen tunggal (16S rRNA) mungkin tidak optimal untuk resolusi taksonomi dalam genus *Vibrio*, menunjukkan perlunya pendekatan genomik lebih komprehensif seperti analisis peurutan multilokus atau peurutan genom lengkap. Secara ekologis, genus *Vibrio* adalah kelompok bakteri sangat plastis dan adaptif terhadap variasi lingkungan laut dengan potensi keragaman metabolik dan fungsional yang belum sepenuhnya dieksplorasi.



Gambar 2.6 Pohon filogenetik bakteri berdasarkan sekuens 16S rRNA

2.5.7 Prediksi struktur protein bakteri laut penghasil protease menggunakan Swiss-model

Pemodelan protein dari hasil sekuensing isolat bakteri *Shewanella algae* dan *Vibrio alginolyticus* melibatkan serangkaian langkah sistematis yang mengubah informasi sekuens asam amino menjadi struktur 3 dimensi yang dapat diprediksi. Langkah pertama adalah analisis sekuens dan kontrol kualitas, di mana hasil sekuensing perlu dibersihkan dari kontaminan, diverifikasi kualitasnya, dan diterjemahkan dari DNA menjadi sekuens protein menggunakan kode genetika yang sesuai. Langkah ini juga melibatkan identifikasi open reading frame (ORF) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>, yang benar dan mengkonfirmasi bahwa sekuens tidak mengandung kodon stop internal yang dapat mengganggu akurasi prediksi struktur. Adapun sekuens asam amino dari kedua isolat tersebut adalah:

- A. MGETLMQPCRVC EEGLRVVKHFQ RGGKGVSMWFNSMQREEPYLLLTSTEFV
 RDTSVPSGTVRQVLHGCRQLVLMPGTLGRLPVINRRKVGTTSSHHGPYEMISH
 TGETRPRLLEAAVG NIAQ**WGKPMRRDLEEYRWRRR**PPGQRLTLRHESVGS
 KQDMSTRSLVSTLGSQANALRPPGYGRKKTSNELGAGGACGLIRCNAKNLTY
 SMALTSRATHVLQWSVQRFVAKPRGGANPIKLVVVRIGVCNSTPMLHRLPPIH
 LKPCRTQAVYLMRMGLAPPRGFATLCTDHCSTCVALLVRAMMT
 (*Shewanella algae*)
- B. MGETLMQPCRVC EEGLRVVKHFQ RGGKGVSMWFNSMQREEPYLLLTSTEFV
 RDTSVPSGTVRQVLHGCRQLVLMPGTLGRLPVINRRKVGTTSSHHGPYEMISH
 TGETRPRLLEAAVG NIAQ**WGKPMRRDLEEYRWRRR**PPGQRLTLRHESVGSK
 QDMSTRSLVSTLGSQANALRPPGYGRKKTSNELGAGGACGLIRCNAKNLTYS
 MALTSRATHVLQWSVQRFVAKPRGGANPIKLVVVRIGVCNSTPMLHRLPPIHL
 KPCRTQAVYLMRMGLAPPRGFATLCTDHCSTCVALLVRAMMT
 (*Vibrio alginolyticus*)

Setelah dilakukan penyelarasan kedua sekuens protein tersebut, ditemukan hanya satu perbedaan di antara keduanya, yaitu pada sekuens A (*Shewanella algae*) terdapat tambahan asam amino P (Prolin) di antara residu K (Lisin) dan M (Metionin) pada fragmen ...WGKPMRRDLEEYRWRRR..., sedangkan pada sekuens B (*Vibrio alginolyticus*) residu Prolin tersebut tidak ada, sehingga fragmennya menjadi ...WGKPMRRDLEEYRWRRR.... Peristiwa ini disebut insersi pada sekuens A atau delesi pada sekuens B, dan memiliki makna biologis yang cukup penting mengingat Prolin merupakan asam amino kaku yang dapat memengaruhi konformasi lokal protein seperti struktur α -heliks maupun β -sheet. Perbedaan satu residu ini meskipun tampak kecil, dapat berdampak pada fungsi biologis protein, terutama jika posisi tersebut berada pada situs aktif, situs pengikatan ligan, atau daerah yang berperan dalam interaksi protein-protein.

Selain itu, perbedaan ini juga dapat mencerminkan adanya tekanan seleksi yang berbeda antara kedua spesies akibat perbedaan lingkungan hidup, di mana *Shewanella algae* lebih banyak ditemukan di lingkungan sedimen laut, sementara *Vibrio alginolyticus* lebih adaptif di lingkungan perairan hangat dan inang biologis. Dari perspektif filogenetik, tingginya tingkat homologi (>99%) antara kedua sekuens ini mengindikasikan bahwa gen penyandi protein ini bersifat sangat terkonservasi selama evolusi, kemungkinan karena protein tersebut memiliki fungsi esensial bagi kelangsungan hidup kedua organisme, dan perbedaan kecil yang ada kemungkinan merupakan hasil mutasi netral atau adaptif yang terjadi setelah kedua spesies berpisah dari nenek moyang yang sama.

Gambar 2.7 (A) menunjukkan hasil pemodelan struktur protein 3 dimensi untuk ORF1 dari bakteri *S. algae* strain DW01 menggunakan platform SWISS-MODEL yang diakses melalui browser web. Model protein ini berhasil menunjukkan kualitas pemodelan yang cukup baik dengan skor GMQE (Global Model Quality Estimation) 0,64 pada skala 0 - 1, menunjukkan bahwa tingkat kepercayaan model berada dalam kategori sedang hingga baik.

Template yang digunakan untuk pemodelan homologi adalah protein A0A3M5GRJ4_1. A yang merupakan Putative ORF58e dari database AlphaFold,

dengan organisme sumber *Pseudomonas savastanoi* (*Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*). Meskipun template berasal dari genus bakteri yang berbeda dari target (*Pseudomonas* vs *Shewanella*), tingkat identitas sekuens tinggi yang mencapai 76,19% dengan cakupan yang baik memberikan dasar yang solid untuk pemodelan struktural. Protein ini diprediksi berfungsi sebagai monomer, yang berarti tidak membentuk kompleks multi-subunit dalam kondisi fisiologis.

Struktur 3 dimensi yang dihasilkan menunjukkan arsitektur protein kompak dengan kombinasi elemen struktur sekunder berupa α -heliks dan β -sheet. Visualisasi menggunakan skema pewarnaan pelangi dari N-terminus (merah) hingga C-terminus (biru/ungu) menunjukkan lipatan protein yang terorganisir dengan baik dengan beberapa domain struktural yang terdefinisi dengan baik. Keberadaan loop dan wilayah turn yang menghubungkan elemen struktur sekunder menunjukkan fleksibilitas struktural yang mungkin penting untuk fungsi protein.

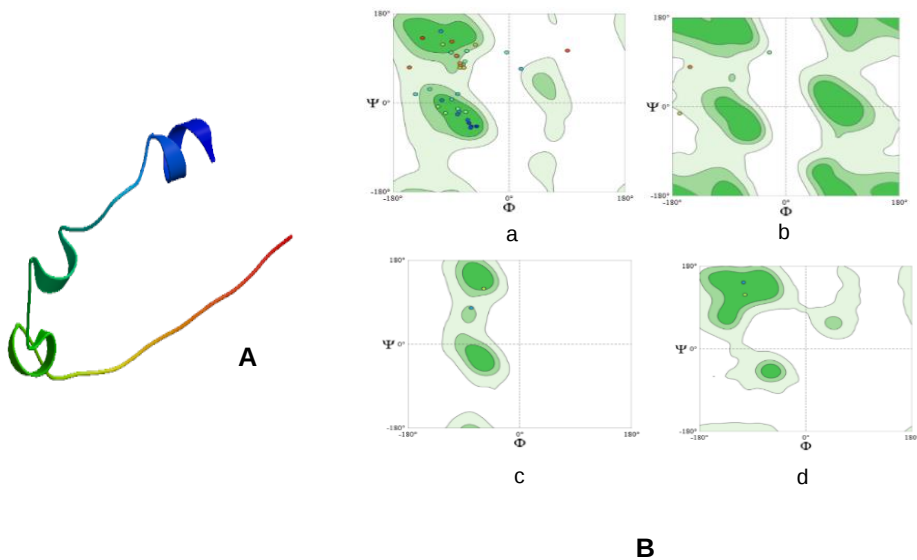
Analisis plot Ramachandran spesifik untuk protein *S. algae* strain DW01 (**Gambar 2.7 (B)**) memberikan wawasan tentang karakteristik struktural protein bakteri laut patogen ini dengan kemampuan adaptasi lingkungan yang luar biasa. Plot umum (a) menunjukkan distribusi konformasi tulang punggung yang khas untuk protein bakteri Gram-negatif anaerobik fakultatif, dengan area hijau mencerminkan wilayah konformasi yang dioptimalkan untuk fungsi dalam kondisi lingkungan laut yang bervariasi. Konsentrasi titik-titik di wilayah alfa-heliks dan beta-sheet menunjukkan bahwa protein *S. algae* strain DW01 mempertahankan struktur sekunder yang stabil sebagai dasar untuk aktivitas enzimatik dan interaksi protein-protein kompleks, khususnya dalam sistem respirasi anaerobik dan metabolisme energi alternatif yang khas untuk genus *Shewanella*.

Plot glisin (b) menampilkan distribusi yang sangat luas, mencerminkan kebutuhan kritis akan fleksibilitas konformasi dalam protein yang berinteraksi dengan membran luar dan sistem transpor elektron. Fleksibilitas tinggi residu glisin sangat penting untuk protein seperti sitokrom c dan komponen sistem transpor elektron eksternal yang memungkinkan *S. algae* strain DW01 untuk melakukan respirasi melalui berbagai akseptor elektron, termasuk oksida logam dan senyawa organik kompleks. Distribusi yang menyebar luas ini juga menunjukkan adaptasi struktural protein terhadap salinitas dan tekanan osmotik yang bervariasi yang dialami oleh bakteri ini di habitat laut dan estuarin, di mana perubahan konformasi protein harus mengakomodasi kondisi fisikokimia yang berfluktuasi.

Plot glisin (b) untuk *S. algae* strain DW01 menampilkan distribusi yang sangat luas, mencerminkan kebutuhan kritis akan fleksibilitas konformasi dalam protein yang berinteraksi dengan membran luar dan sistem transpor elektron. Fleksibilitas tinggi residu glisin sangat penting untuk protein seperti sitokrom c dan komponen sistem transpor elektron eksternal yang memungkinkan *S. algae* strain DW01 untuk melakukan respirasi melalui berbagai akseptor elektron, termasuk oksida logam dan senyawa organik kompleks. Distribusi yang menyebar luas ini juga menunjukkan adaptasi struktural protein terhadap salinitas dan tekanan osmotik yang bervariasi yang dialami oleh bakteri ini di habitat laut dan estuarin, di mana perubahan konformasi protein harus mengakomodasi kondisi fisikokimia yang berfluktuasi.

Plot prolin (c) menunjukkan pembatasan konformasi yang sangat ketat, mencerminkan peran kritis residu prolin dalam mempertahankan struktur rigid pada

protein kunci *S. algae* strain DW01 yang terlibat dalam patogenesis dan virulensi. Konformasi yang dibatasi ini sangat penting untuk protein yang berinteraksi dengan siderofor dan sistem pengikatan ion besi, di mana presisi struktural diperlukan untuk afinitas dan spesifisitas pengikatan yang optimal. Struktur siklik prolin memberikan stabilitas termal dan kimia yang diperlukan bagi protein *S. algae* strain DW01 untuk mempertahankan fungsi dalam kondisi stres oksidatif dan variasi pH yang sering ditemui di jaringan inang selama infeksi



Gambar 2.7 (A) Prediksi struktur protein *Shewanella algae* strain DW01; (B) Plot Ramachandran (a) umum, (b) glisin, (c) prolin, dan (d) pro-prolin

Plot pro-prolin (d) mengungkapkan pembatasan konformasi yang ekstrem, menunjukkan bahwa *S. algae* menggunakan motif struktural pro-prolin untuk menciptakan belokan dan loop yang sangat spesifik dalam protein yang terlibat dalam adhesi, invasi, dan penghindaran sistem imun inang. Wilayah yang sangat dibatasi ini menunjukkan bahwa sekuens pro-prolin dalam protein *S. algae* berfungsi sebagai penghubung struktural rigid antara domain fungsional, memastikan orientasi spasial yang tepat untuk interaksi molekuler kompleks. Karakteristik ini sangat relevan untuk protein permukaan sel dan faktor virulensi yang memerlukan konformasi yang sangat presisi untuk berinteraksi dengan reseptor sel inang dan menghindari deteksi oleh sistem imun adaptif, mencerminkan evolusi molekuler *S. algae* strain DW01 yang telah berhasil beradaptasi dengan lingkungan laut maupun inang vertebrata.

Pemodelan struktur protein *S. algae* DW01 mengungkap strategi molekuler yang mendukung keberhasilan hidup gandanya: fleksibilitas konformasi tinggi pada residu glisin memungkinkan adaptasi cepat melalui modulasi protein permukaan dan perubahan metabolisme selama transisi dari lingkungan laut ke inang, sementara kekakuan konformasi pada motif pro-prolin menjamin stabilitas struktur kunci untuk

virulensi dan patogenesis. Secara klinis, pemahaman ini membuka jalur terapeutik baru untuk merancang inhibitor yang mengganggu fleksibilitas adaptif atau kekakuan virulensi, serta pengembangan biosensor dan vaksin berbasis epitop stabil. Implikasi evolusioner yang mendalam menunjukkan bahwa tekanan selektif ganda dari habitat laut dan interaksi inang telah membentuk *S. algae* menjadi generalis molekuler yang mampu mengoptimalkan fungsi protein untuk konteks berbeda sambil mempertahankan identitas spesiesnya yang koheren.

Gambar 2.8 (A) menunjukkan hasil pemodelan struktur protein 3 dimensi untuk ORF4 dari bakteri *V. alginolyticus* strain NBRC 15630 menggunakan platform SWISS-MODEL yang diakses melalui browser web. Halaman ini menampilkan hasil pemodelan untuk model 01 dengan status Oligo-State Monomer dan nilai GMQE (Global Model Quality Estimation) 0,64, menunjukkan kualitas model yang cukup baik.

Template yang digunakan adalah A0A3M5GRJ4_1 A Putative oRF58e, yang merupakan model AlphaFold DB dari protein A0A3M5GRJ4_PSESS dengan organisme *Pseudomonas savastanoi*. Data menunjukkan identitas sekuens 88,10% dengan cakupan tinggi, menunjukkan kesesuaian template yang baik untuk pemodelan homologi. Informasi Model-Template Alignment juga tersedia untuk analisis lebih lanjut.

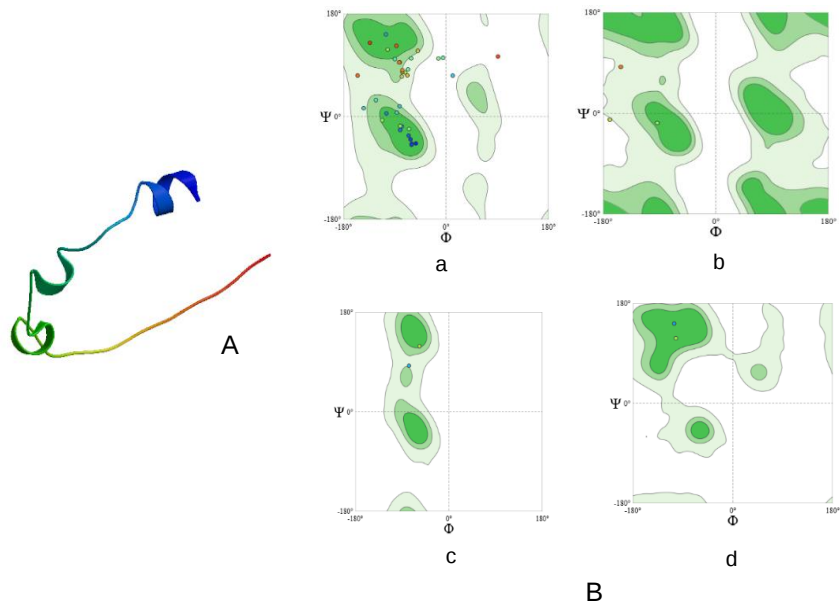
Visualisasi struktur 3D protein menunjukkan representasi pita dengan warna gradien dari merah ke ungu. Struktur ini menunjukkan karakteristik protein dengan beberapa domain terlipat, termasuk loop dan turn yang kompleks. Ada juga panel kontrol di bagian bawah untuk memanipulasi tampilan struktur, termasuk opsi untuk pengaturan karbon dan fitur visualisasi lainnya. Antarmuka ini memungkinkan peneliti untuk melakukan analisis struktur protein interaktif dan mengunduh hasil untuk analisis lebih lanjut.

Gambar 2.8 (B) menunjukkan analisis plot Ramachandran untuk protein *V. alginolyticus* strain NBRC 15630, yang terdiri dari 4 panel berbeda yang masing-masing menganalisis distribusi sudut dihedral phi (ϕ) dan psi (ψ) untuk kategori residu asam amino yang berbeda. Panel (a) menunjukkan plot Ramachandran umum yang mencakup semua residu asam amino dalam struktur protein. Distribusi titik-titik hijau menunjukkan konformasi stereokimia yang diperbolehkan, dengan konsentrasi tinggi di wilayah alfa heliks (kuadran kiri bawah) dan beta sheet (kuadran kiri atas). Distribusi residu di wilayah yang diperbolehkan menunjukkan kualitas struktur protein yang baik.

Panel (b) secara khusus menganalisis residu glisin, yang memiliki fleksibilitas konformasi tertinggi karena rantai sampingnya hanya terdiri dari atom hidrogen. Distribusi yang lebih luas yang terlihat dalam plot ini menunjukkan bahwa glisin dapat mengadopsi berbagai konformasi yang tidak dapat diakses oleh asam amino lain, termasuk wilayah yang biasanya terlarang untuk residu lain.

Panel (c) dan (d) menganalisis residu prolin dan pre-prolin (residu yang langsung sebelum prolin dalam sekuens). Prolin memiliki struktur siklik yang membatasi fleksibilitasnya, sehingga distribusinya lebih terbatas pada wilayah tertentu dalam plot Ramachandran. Pola distribusi terbatas ini mencerminkan kendala geometris unik prolin karena ikatan kovalen antara rantai samping dan tulang punggung protein, yang menghasilkan sudut phi yang relatif tetap sekitar 60°.

Hasil plot Ramachandran untuk protein *V. alginolyticus* strain NBRC 15630 memiliki signifikansi yang sangat penting dalam memvalidasi kualitas struktur protein dan implikasinya untuk fungsi biologis. Distribusi residu yang terkonsentrasi di wilayah yang diperbolehkan secara stereokimia dalam keempat panel menunjukkan bahwa struktur protein yang dianalisis memiliki kualitas yang sangat baik dan realistis secara biofisik, yang merupakan indikator krusial bahwa tidak ada masalah signifikan dalam proses penentuan struktur atau pemodelan yang dilakukan.



Gambar 2. 8 (A) Prediksi struktur protein *V. alginolyticus* strain NBRC 15630 (B) Plot Ramachandran (a) umum, (b) glisin, (c) prolin, dan (d) pro-prolin

Pola distribusi yang sesuai dengan ekspektasi teoritis untuk setiap kategori residu asam amino mengkonfirmasi karakteristik struktural normal dari protein ini. Fleksibilitas tinggi yang ditunjukkan oleh residu glisin, kendala konformasi khas prolin, dan distribusi umum residu di wilayah alfa heliks dan beta sheet klasik semuanya menunjukkan bahwa protein ini memiliki arsitektur molekuler yang stabil dan fungsional. Kesesuaian ini sangat penting karena menunjukkan bahwa protein kemungkinan dapat melakukan fungsi biologisnya secara optimal, mengingat bahwa struktur yang tepat adalah prasyarat untuk aktivitas katalitik, spesifisitas pengikatan, dan stabilitas protein dalam lingkungan seluler yang kompleks.

Perspektif penelitian terapan, validasi Ramachandran yang baik ini memberikan tingkat kepercayaan tinggi bahwa struktur protein dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut, seperti desain obat, rekayasa protein, atau studi interaksi molekuler. Struktur dengan validasi yang solid menjadi fondasi yang dapat diandalkan untuk pengembangan aplikasi bioteknologi, terutama dalam konteks karakterisasi

molekuler strain NBRC 15630. Hasil ini tidak hanya memberikan wawasan tentang kualitas protein yang dihasilkan oleh organisme ini tetapi juga relevan untuk pemahaman yang lebih dalam tentang mekanisme patogenisitas *V. alginolyticus* dan aplikasi potensialnya dalam bioteknologi laut dan medis.

Tabel 2.6 merupakan perbandingan validasi struktur 3 menggunakan data Hasil Mol-Probity bertujuan untuk melakukan evaluasi komprehensif terhadap kualitas dan keandalan struktur protein dari 2 spesies bakteri yang berbeda, yaitu *S. algae* dan *V. alginolyticus*. Tabel ini berfungsi sebagai tolok ukur kontrol kualitas sistematis untuk memastikan bahwa struktur protein yang telah ditentukan atau dimodelkan memiliki akurasi geometris dan stereokimia yang dapat diterima sebelum digunakan untuk analisis biologis lebih lanjut. Dengan menggunakan berbagai parameter validasi standar seperti MolProbity Score, Clash Score, analisis Ramachandran, dan rotamer outliers, tabel ini memberikan gambaran komprehensif tentang tingkat kepercayaan yang dapat diberikan pada setiap struktur protein. Selain itu, tabel ini bertujuan untuk mengidentifikasi perbedaan struktural spesifik antara protein homolog dari kedua spesies bakteri, yang dapat memberikan wawasan tentang evolusi molekuler dan hubungan filogenetik antara *S. algae* dan *V. alginolyticus*. Perbandingan langsung memungkinkan peneliti untuk memahami bagaimana variasi sekuens asam amino pada posisi tertentu dapat mempengaruhi stabilitas struktural lokal, fleksibilitas protein, dan implikasi fungsional potensial. Informasi ini sangat berharga untuk studi genomik komparatif dan dapat membantu dalam memahami kemungkinan adaptasi struktural yang terkait dengan ceruk ekologi yang berbeda dari 2 spesies bakteri tersebut.

Perspektif aplikasi praktis, tabel ini juga berfungsi sebagai panduan untuk menentukan struktur mana yang lebih sesuai untuk aplikasi hilir tertentu, seperti desain obat, rekayasa protein, atau studi interaksi molekuler. Dengan mengidentifikasi residu outlier spesifik dan wilayah bermasalah, peneliti dapat membuat keputusan yang tepat tentang apakah struktur cukup akurat untuk tujuan penelitian mereka atau memerlukan perbaikan lebih lanjut sebelum digunakan dalam eksperimen komputasi atau desain molekuler.

Analisis komparatif validasi struktur protein antara *S. algae* dan *V. alginolyticus* menunjukkan karakteristik kualitas struktural yang sangat mirip tetapi dengan beberapa perbedaan spesifik yang signifikan. Kedua protein memiliki Mol-Probity Score yang identik yaitu 1,92, menunjukkan kualitas struktural yang dapat diterima, dengan Clash Score 0,00 yang menunjukkan tidak ada konflik sterik antara atom dalam kedua struktur. Persentase residu yang terletak di wilayah Ramachandran favoured juga identik yaitu 65%, menunjukkan bahwa sebagian besar konformasi tulang punggung protein berada dalam rentang yang disukai secara energetik.

Tabel 2.7 Hasil Mol-Probity

Kategori	Nilai	
	<i>Shewanella algae</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Mol-Probity Score	1.92	1.92
Clash Score	0.00	0.00
Ramachandran Favoured	65%	65.00%
Ramachandran Outliers	12.50%	12.50%
	A40 GLN, A29 GLY, A12 TYR, A21 GLY, A18 THR	A40 GLN, A29 GLY, A21 SER, A18 ARG, A12 TYR
Rotamer Outliers	5.13%	5.13%
	A16 THR, A35 LEU	A16 THR, A35 LEU
C-Beta Deviation	0	0
Bad Bonds	0/342	0/350
Bad Angels	2/463	3/3742
	(A17 SER-A18 THR), A41 LEU	(A11 PRO-A12 TYR), (A26 VAL-A27 PRO), (A17 SER-A18 ARG)
Twisted Proline	Non-2/39	2/39
	(A39 ARG-A40 GLN), (A40 GLN-A41 LEU)	(A39 ARG-A40 GLN), (A40 GLN-A41 LEU)

Perbedaan mencolok terlihat dalam identifikasi Ramachandran outliers, di mana kedua protein memiliki persentase yang sama (12,50%) tetapi dengan residu spesifik yang berbeda. *S. algae* menunjukkan outliers pada residu A40 GLN, A29 GLY, A12 TYR, A21 GLY, dan A18 THR, sedangkan *V. alginolyticus* memiliki outliers pada A40 GLN, A29 GLY, A21 SER, A18 ARG, dan A12 TYR. Perbedaan ini menunjukkan variasi dalam fleksibilitas struktural lokal antara kedua protein, di mana substitusi asam amino pada posisi tertentu (GLY → SER pada posisi 21 dan THR → ARG pada posisi 18) dapat secara signifikan mempengaruhi konformasi tulang punggung.

Analisis rotamer outliers menunjukkan pola identik pada kedua protein (5,13%) dengan residu yang sama A16 THR dan A35 LEU, menunjukkan bahwa masalah konformasi rantai samping terjadi pada posisi konservatif. Parameter validasi lain, seperti deviasi C-Beta dan bad bonds, menunjukkan hasil yang sangat baik untuk kedua protein (nilai 0), tetapi ada perbedaan dalam bad angles, di mana *S. algae* memiliki 2/463 sedangkan *V. alginolyticus* memiliki 3/474. yang berbeda, dengan *S. algae* menunjukkan tulang punggung twisted pada (A17 SER-A18 THR) dan A41 LEU, sedangkan *V. alginolyticus* memiliki masalah di beberapa segmen termasuk (A11 PRO-A12 TYR), (A26 VAL-A27 PRO), dan (A17 SER-A18 ARG), menunjukkan

bahwa perbedaan sekuens dapat mempengaruhi fleksibilitas dan ketegangan lokal dalam struktur protein.

Pemodelan protein pada penelitian ini menghasilkan beberapa kebaruan penting yang belum dilaporkan khususnya untuk bakteri laut Indonesia. Kebaruan utama terletak pada identifikasi tiga penggantian asam amino spesifik pada posisi 19 (Thr→Arg), 22 (Glu→Leu), dan 29 (Val→Leu) yang merupakan temuan baru untuk protein protease dari bakteri laut Indonesia dalam perbandingan genus *Shewanella* dan *Vibrio*. Penggantian pada posisi 22 dari Glu ke Leu sangat signifikan karena merupakan perubahan dari asam amino bermuatan negatif ke hidrofobik netral yang berpotensi mempengaruhi interaksi elektrostatis dengan substrat, kestabilan struktur lokal, dan mekanisme katalitik enzim. Kebaruan kedua adalah penemuan motif terkonservasi pada wilayah terminal dengan identitas 92,7% dan konservasi 100% pada wilayah N-terminal (posisi 1-18) dan C-terminal (posisi 30-41).

Motif spesifik MWFNSMQREEPYLLL dan PSGT[VL]RQVLHGCRQLVL yang teridentifikasi belum pernah dilaporkan sebagai motif terkonservasi untuk protease dari genus *Shewanella* dan *Vibrio* Indonesia. Penelitian Chelliah et al., (2022) tentang protease alkalin serin dari *Shewanella algae* yang diisolasi dari rumput laut coklat *Sargassum myriocystum* di India mengidentifikasi protein berukuran 45 kDa dengan stabilitas pada pH 7,0-10,0 dan suhu 40-60°C, namun tidak melaporkan motif terminal pendek seperti yang ditemukan dalam penelitian ini. Studi Johnson et al., (2025) tentang *Shewanella* dari Teluk Chesapeake menemukan bahwa 45% isolat menunjukkan aktivitas beta-hemolitik dengan *S. algae* sebagai patogen yang muncul NCBI, namun tidak mengeksplorasi dasar struktural molekuler untuk aktivitas ini.

Berdasarkan aspek struktural, penelitian ini menemukan pola titik menyimpang Ramachandran yang berbeda antara kedua protein, menunjukkan bahwa posisi 21 dan 18 adalah titik panas fleksibilitas konformasi yang berbeda antar genus. Penelitian Yun et al., (2024) tentang genom *Shewanella* sp. H8 dari Antartika mengidentifikasi 91 gen pengkode protease yang diklasifikasikan dalam enam kategori berdasarkan tipe katalitiknya InterPro, namun tidak melakukan analisis komparatif struktural detail seperti dalam penelitian ini. Penggantian GLY→SER pada posisi 21 dan THR→ARG pada posisi 18 mengubah bentang energi lokal, yang merupakan temuan baru terkait wilayah yang mungkin terlibat dalam adaptasi substrat spesifik atau optimasi pH dan suhu.

Penelitian Carra et al., (2019) melakukan pemodelan homologi untuk membandingkan kolagenase dari *V. alginolyticus* dan *V. parahaemolyticus*, menemukan kesamaan struktural tinggi dengan konfigurasi sadel khas, serta protein 90 kDa dengan domain katalitik yang mengandung motif H477EYVH481 untuk koordinasi Zn²⁺ eLife, namun tidak mengidentifikasi hotspot fleksibilitas konformasi spesifik atau pola penggantian asam amino yang terlokalisasi seperti yang ditemukan dalam penelitian ini. Penelitian Lee et al., (2000) tentang protease alkalin serin *V. alginolyticus* mengidentifikasi toksin berukuran 33 kDa dengan aktivitas maksimal pada pH 8-11 dan titik isoelektrik, namun tidak memberikan informasi struktural detail untuk rekayasa protein. Kebaruan evolusioner yang penting adalah penemuan pola keberagaman yang terlokalisasi pada wilayah tengah (posisi 19-29) sementara

wilayah terminal sangat terkonservasi. Pola ini menunjukkan strategi evolusioner berupa konservasi mesin katalitik inti dengan keberagaman periferai untuk optimasi lokal.

Studi Zhou et al., (2009) menunjukkan bahwa gen protease alkalin serin A (asp) adalah faktor virulensi penting dalam *V. alginolyticus* dengan mutan nol asp menunjukkan penurunan 15 kali lipat dalam virulensi, namun tidak mengeksplorasi dasar struktural untuk aktivitas ini atau pola evolusioner penggantian asam amino. Berdasarkan aspek metodologi, penelitian ini merupakan studi komparatif pertama yang membandingkan struktur protein protease dari *Shewanella* dan *Vibrio* isolat Indonesia secara detail menggunakan pendekatan lintas-genus. Penelitian Chen et al., (2012) tentang pemodelan homologi protease alkalin laut dari Laut Kuning menggunakan metode penyelarasan templat multipel menghasilkan model dengan skor ERRAT 80,657 dan 94% residu di wilayah paling disukai, namun fokus pada satu protein tunggal tanpa perbandingan lintas-genus.

Keberhasilan penggunaan templat dari *Pseudomonas savastanoi* untuk memodelkan protein dari genus berbeda dengan hasil GMQE 0,64 yang konsisten meskipun identitas templat berbeda (76,19% vs 88,10%) menunjukkan kebaruan metodologis bahwa pemodelan homologi dapat diandalkan lintas genus jika identitas sekuens lebih dari 75%. Kebaruan aplikatif yang dihasilkan adalah identifikasi peta struktural yang jelas untuk rekayasa protein, dengan wilayah terkonservasi (1-18 dan 30-41) dan wilayah bervariasi (19-29) yang memberikan target rasional untuk mutagenesis terarah, pertukaran domain, dan desain rasional. Motif terkonservasi yang teridentifikasi dapat digunakan sebagai primer degenerat untuk amplifikasi gen protease dari bakteri laut lain, urutan penanda untuk identifikasi cepat, dan referensi basis data untuk studi metagenomik perairan Indonesia. Aplikasi ini melengkapi penelitian sebelumnya yang lebih fokus pada karakterisasi biokimia atau produksi enzim tanpa memberikan detail struktural untuk rekayasa protein. Namun demikian, penting untuk dicatat bahwa protein dengan panjang 41 asam amino sangat pendek untuk enzim protease fungsional lengkap yang biasanya memiliki 200-500 asam amino. Ini menunjukkan bahwa protein yang dianalisis kemungkinan merupakan peptida sinyal, domain kecil dari protein lebih besar, atau fragmen ORF yang tidak lengkap, sehingga perlu dilakukan prediksi ORF ulang dengan parameter berbeda untuk memastikan sekuens protein yang lengkap.

2.6 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian isolasi, purifikasi, dan skrining bakteri laut penghasil protease dari Pantai Losari, Makassar, dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolasi dan purifikasi menghasilkan 25 isolat murni bakteri Gram negatif yang terdiri dari 15 isolat sedimen (MB-SL) dan 10 isolat air laut (MB-WL), dengan pigmentasi krem kuning yang mengindikasikan produksi karotenoid sebagai mekanisme adaptasi terhadap stres lingkungan laut.
2. Isolat sedimen menunjukkan aktivitas proteolitik lebih tinggi (60%, 9 dari 15 isolat; indeks 11,1–14,1 mm) dibandingkan isolat air laut (20%, 2 dari 10 isolat; indeks 10,10–11,03 mm), dengan MB-SL5 memiliki aktivitas tertinggi ($14,1 \pm 0,9$ mm) diikuti MB-SL6 ($13,2 \pm 0,8$ mm).
3. Identifikasi molekuler melalui sekuensing gen 16S rRNA menunjukkan isolat MB-SL5 adalah *Shewanella algae* (97,82% kemiripan, bootstrap 99%) yang bersifat nonfermentatif dengan respirasi anaerob, sedangkan MB-SL6 adalah *Vibrio alginolyticus* (90,53% kemiripan, bootstrap 52%) yang bersifat fermentatif dengan fleksibilitas metabolik tinggi. Perbedaan karakteristik metabolik mencerminkan partisi niche ekologis berbeda dengan potensi aplikasi bioteknologi industri yang beragam.
4. Pemodelan struktur protein *Shewanella algae* dan *Vibrio alginolyticus* menghasilkan model berkualitas tinggi (GMQE 0.64) yang divalidasi dengan baik melalui analisis Ramachandran dan MolProbity. *S. algae* menunjukkan identitas sekuens tinggi yang mencapai 76,19%, sementara *V. alginolyticus* menunjukkan identitas sekuens 88,10%

2.7 Daftar Pustaka

- Abrar HT. 2017. Isolation and Screening of Protease-Producing Bacteria from the Local Environment for Use as a Detergent Additive. *American Journal of Life Sciences*, 5(5), 116–120. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20170505.11>.
- Abrar T, Hamza TA, & Woldesenbet F. 2017. Optimization of Culture Growth Parameters for Production of Protease from Bacteria Isolated from Soil. *Bioscience and Bioengineering*, 3(1), 1–10. <http://www.aiscience.org/journal/bio>.
- Abreu CI, Dal Bello M, Bunse C, Pinhassi J, & Gore J. 2023. Warmer temperatures favor slower-growing bacteria in natural marine communities. *Science Advances*, 9(19), eade8352. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade8352>.
- Ackermann M. 2015. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 497–508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>.
- Agarwal H, Bajpai S, Mishra A, Kohli I, Varma A, Fouillaud M, Dufossé L, & Joshi NC. 2023. Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications. *Microorganisms*, 11(3), 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030614>.
- Ahmad Reza F. 2025. Akses dan Pembagian Manfaat Sumber Daya Genetik Indonesia oleh Negara Lain dalam Konteks Komersialisasi serta Penyelesaian Sengketanya Berdasarkan Perjanjian Internasional yang Berlaku di Indonesia. *Jurnal Ilmu Hukum, Humaniora Dan Politik*, 5(3), 1691–1703. <https://doi.org/10.38035/jihhp.v5i3.3871>.
- Amin OE, Aboul Enein AM, Abd-Elsalam IS, Wahba MI, & Helmy YS. 2025. Optimization of protease production by newly isolated *Bacillus* sp. from the Red Sea using defatted soybean cake. *Scientific Reports*, 15(1), 32118. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-14643-3>.
- Anand SS, Nair BG, Sadasivan Nair S, & Gopalakrishna Pai J. 2025. Proteases from marine endophyte, *Bacillus subtilis* ULB16: Unlocking the industrial potential of a marine-derived enzyme source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 64, 103503. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103503>.
- Andryukov B, Mikhailov V, & Besednova N. 2019. The biotechnological potential of secondary metabolites from marine bacteria. *Journal of Marine Science and Engineering*, 7(6), 176. <https://doi.org/10.3390/jmse7060176>.
- Aruna V, Chandrakala V, Angajala G, & Nagarajan ER. 2023. Proteases: An overview of their recent industrial developments and current scenario in the revolution of biocatalysis. *Materials Today: Proceedings*, 92, 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.03.806>.
- Arya PS, Yagnik SM, Rajput KN, Panchal RR, & Raval VH. 2021. Understanding the Basis of Occurrence, Biosynthesis, and Implications of Thermostable Alkaline Proteases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(12), 4113–4150. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03701-x>.

- Balume I, Agumas B, Musyoki M, Marhan S, Cadisch G, & Rasche F. 2022. Potential proteolytic enzyme activities modulate archaeal and bacterial nitrifier abundance in soils differing in acidity and organic residue treatment. *Applied Soil Ecology*, 169, 104188. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104188>.
- Barzkar N. 2020. Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072>.
- Bellali S, Bou Khalil J, Fontanini A, Raoult D, & Lagier JC. 2020. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiological Research*, 236, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>.
- Blakely GW. 2024. Chapter 15 - Mechanisms of horizontal gene transfer and DNA recombination. In Y-W Tang, MY Hindiyeh, D Liu, A Sails, P Spearman, & J-R Zhang (Eds.), *Molecular Medical Microbiology* (Third Edition) (pp. 309–324). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00043-5>.
- Bond JS. 2019. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1643–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004156>.
- Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, & Khelaifia S. 2020. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>.
- Boondaeng A, Trakunjae C, Vaithanomsat P, & Niyomvong N. 2025. Isolation of marine bacteria with potential for polyhydroxyalkanoate degradation and optimization for enzyme production. *Scientific Reports*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-99034-4>.
- Brauer AM, Shi H, Levin PA, & Huang KC. 2023. Physiological and regulatory convergence between osmotic and nutrient stress responses in microbes. *Current Opinion in Cell Biology*, 81, 102170. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102170>.
- Bremer E, & Krämer R. 2019. Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annual Review of Microbiology*, 73, 313–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115504>.
- Brown SD, & Babbitt PC. 2014. New insights about enzyme evolution from large-scale studies of sequence and structure relationships. *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30221–30228. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.569350>.
- Caudal F, Roullier C, Rodrigues S, Dufour A, Artigaud S, Le Blay G, Bazire A, & Petek S. 2024. Anti-Biofilm Extracts and Molecules from the Marine Environment. *Marine Drugs*, 22(7), 313. <https://doi.org/10.3390/md22070313>.
- Chapman J, Ismail AE, & Dinu CZ. 2018. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.

- Chauhan A, & Jindal T. 2020a. Biochemical and Molecular Methods for Bacterial Identification. In *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis* (pp. 425–468). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-52024-3_10.
- Chauhan A, & Jindal T. 2020b. Microbiological Culture Media: Types, Role, and Composition. In *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis* (pp. 23–66). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-52024-3_3.
- Chauhan B, Sharma B, & Singh H. 2020. Swiss-Model: A web-based computational tool for designing of protein structures. *Biotech Today*, 10(2), 43–44. <https://doi.org/10.5958/2322-0996.2020.00025.3>.
- Chen J, Jia Y, Sun Y, Liu K, Zhou C, Liu C, Li D, Liu G, Zhang C, Yang T, Huang L, Zhuang Y, Wang D, Xu D, Zhong Q, Guo Y, Li A, Seim I, Jiang L, & Fan G. 2024. Global Marine Microbial Diversity and Its Potential in Bioprospecting *Nature*, 633(8029), 371–379. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07891-2>.
- Chen X-L, Wang Y, Wang P, & Zhang Y-Z. 2020. Proteases from the marine bacteria in the genus *Pseudoalteromonas*: diversity, characteristics, ecological roles, and application potentials. *Marine Life Science & Technology*, 2(4), 309–323. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00058-8>.
- Cheng TH, Ismail N, Kamaruding N, Saidin J, & Danish-Daniel M. 2020. Industrial enzymes-producing marine bacteria from marine resources. *Biotechnology Reports*, 27, e00482. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00482>.
- Cramer P. 2019. Organization and regulation of gene transcription. *Nature*, 573(7772), 45–54. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4>.
- Culp EJ, & Goodman AL. 2023. Cross-feeding in the gut microbiome: Ecology and mechanisms. *Cell Host & Microbe*, 31(4), 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.016>.
- Carra S, Contaldo M, Scala MC, & Schiraldi C. 2019. Vibrio proteases for biomedical applications: Modulating the proteolytic secretome of *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* for improved enzymes production. *Marine Drugs*, 17(11), 635. <https://doi.org/10.3390/md17110635>.
- Chelliah R, Wei S, Daliri EBM, Rubab M, Elahi F, Yeon SJ, Jo KM, Park JS, Barathikannan K, Kim N, Kang EY, Liu S, Wang J, & Oh DH. 2022. Biosynthesis, protease optimization and purification of alkaline serine from *Shewanella* algae and its potential application as silver recovery. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 40, 102229. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102229>.
- Chen XL, Zhang YZ, Gao PJ, & Luan XW. 2012. Homology modeling and molecular dynamics simulation studies of a marine alkaline protease. *Biotechnology Letters*, 34(12), 2217–2224. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1022-2>.

- Dai Z, Li Y, Zhang Y, Xiang T, Peng J, Mao X, Fan Y, Wang F, Yang S, & Cao W. 2025. Nutrient enrichment by high aquaculture effluent input exacerbates imbalances between methane production and oxidation in mangrove sediments. *Water Research*, 280, 123552. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2025.123552>.
- Dal Bello M, & Abreu CI. 2024. Temperature structuring of microbial communities on a global scale. *Current Opinion in Microbiology*, 82, 102558. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102558>.
- Danilova I, & Sharipova M. 2020. The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>.
- Danovaro R, Levin LA, Fanelli G, Scenna L, & Corinaldesi C. 2024. Microbes as marine habitat formers and ecosystem engineers. *Nature Ecology & Evolution*, 8(8), 1407–1419. <https://doi.org/10.1038/s41559-024-02407-7>.
- Daoud L, & Ben Ali M. 2020. Chapter 5 - Halophilic microorganisms: An Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and the environment. In R. Salwan & V Sharma (Eds.), *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 51–64). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00005-8>.
- Dassarma S, & Dassarma P. 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>.
- de Oliveira BFR, & Yusuff Y. 2024. Culturing enigmatic marine bacteria. *Nature Microbiology*, 9(1), 6–7. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01567-9>.
- De Servi B, Meloni M, Saaïd A, & Culig J. 2020. In vitro Comparison of Safety and Efficacy of Diluted Isotonic Seawater and Electrodialyzed Seawater for Nasal Hygiene. *Medical Devices*, 13, 391–398. <https://doi.org/10.2147/MDER.S285593>.
- de Vries W, Du E, & Butterbach-Bahl K. 2014. Short and Long-Term Impacts of Nitrogen Deposition on Carbon Sequestration by Forest Ecosystems. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 9–10, 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2014.09.001>.
- Devault M, Woolf D, & Lehmann J. 2025. Nutrient recycling potential of excreta for global crop and grassland production. *Nature Sustainability*, 8(1), 99–111. <https://doi.org/10.1038/s41893-024-01467-8>.
- Dey S, Botta S, Kallam R, Angadala R, & Andugala J. 2021. Seasonal variation in water quality parameters of Gudlavalleru Engineering College pond. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100058>.
- Dhanak MR, & Xiros NI. 2016. Springer handbook of ocean engineering. Springer Handbook of Ocean Engineering, 1–1345. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16649-0>.

- Dolbeth M, & Arenas F. 2020. Marine Ecosystems: Types, Their Importance and Main Impacts. In W Leal Filho, AM Azul, L Brandli, A Lange Salvia, & T Wall (Eds.), *Life Below Water* (pp. 1–17). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71064-8_38-1.
- Dubey CK, Mishra J, Nagar A, Gupta MK, Sharma A, Kumar S, Mishra V, & Pandey HP. 2024. Chapter 12 - Microbial protease: an update on sources, production methods, and applications. In V Mishra, J Mishra, & NK Arora (Eds.), *Bioactive Microbial Metabolites* (pp. 233–260). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18568-7.00006-9>.
- El-Hassayeb HEA, & Abdel Aziz SMZ. 2016. Screening, Production and Industrial Application of Protease Enzyme from Marine Bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(7), 863–874. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.507.099>.
- Fasim A, More VS, & More SS. 2021. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.
- Fenchel T, King GM, & Blackburn TH. 2012. Chapter 2 - Transport Mechanisms. In T Fenchel, GM King, & TH Blackburn (Eds.), *Bacterial Biogeochemistry* (Third Edition) (pp. 35–47). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415836-8.00002-5>.
- Feng Q, Ma G, Zhou K, Chang T, Zheng Z, Zheng X, Tan E, Lai Y, Zheng L-W, & Kao S-J. 2024. Influence of Terrigenous Inorganic Nitrogen on Marine Nitrogen Cycle Reconstruction Inferred from Sedimentary Bulk Nitrogen Isotope. *Chemical Geology*, 670, 122449. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2024.122449>.
- Fermepin S, Watson JEM, Grantham HS, & Mendez M. 2024. Global marine conservation priorities for sustaining marine productivity, preserving biodiversity and addressing climate change. *Marine Policy*, 161, 106016. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2024.106016>.
- Franco-Duarte R, Černáková L, Kadam S, Kaushik KS, Salehi B, Bevilacqua A, Corbo MR, Antolak H, Dybka-Stępień K, Leszczewicz M, Relison Tintino S, Alexandrino de Souza VC, Sharifi-Rad J, Coutinho HDM, Martins N, & Rodrigues CF. 2019. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>.
- Gado JE, Knotts M, Shaw AY, Marks D, Gauthier NP, Sander C, & Beckham GT. 2025. Machine learning prediction of enzyme optimum pH. *Nature Machine Intelligence*, 7(5), 716–729. <https://doi.org/10.1038/s42256-025-01026-6>.
- Gibbons SM, & Gilbert JA. 2015. Microbial diversity--exploration of natural ecosystems and microbiomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.qde.2015.10.003>.

- Godwin CM, & Cotner JB. 2015. Aquatic heterotrophic bacteria have highly flexible phosphorus content and biomass stoichiometry. *The ISME Journal*, 9(10), 2324–2327. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.34>.
- Gupta MK. 2023. Chapter 1 - Isolation of microorganisms. In AK Bhatt, RK Bhatia, & TC Bhalla (Eds.), *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 3–21). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00001-5>.
- Hasan MJ, Haque P, & Rahman MM. 2022. Protease enzyme based cleaner leather processing: A review. *Journal of Cleaner Production*, 365, 132826. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132826>.
- Heuser E, Becker K, & Idelevich EA. 2023. Evaluation of an Automated System for the Counting of Microbial Colonies. *Microbiology Spectrum*, 11(4), e00673-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00673-23>.
- Haddad Y, Adam V, & Heger Z. 2020. Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLOS Computational Biology*, 16(4), e1007449. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007449>.
- Hossain TJ. 2024. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>.
- Hou J, Wang C, Rozenbaum RT, Gusnaniar N, de Jong ED, Woudstra W, Geertsema-Doornbusch GI, Atema-Smit J, Sjollem J, Ren Y, Busscher HJ, & van der Mei HC. 2019. Bacterial Density and Biofilm Structure Determined by Optical Coherence Tomography. *Scientific Reports*, 9(1), 9794. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46196-7>.
- Huang R, Crowther TW, Sui Y, Sun B, & Liang Y. 2021. High stability and metabolic capacity of bacterial community promote the rapid reduction of easily decomposing carbon in soil. *Communications Biology*, 4(1), 1376. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02907-3>.
- Hubert A, Tabuteau H, Farasin J, Loncar A, Dufresne A, Méheust Y, & Le Borgne T. 2024. Fluid flow drives phenotypic heterogeneity in bacterial growth and adhesion on surfaces. *Nature Communications*, 15(1), 6092. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49997-1>.
- Hutchins DA, & Fu F. 2017. Microorganisms and ocean global change. *Nature Microbiology*, 2(6), 17058. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.58>.
- Islam F, & Roy N. 2018. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC Research Notes*, 11(1), 445. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4>.
- Jamal GA, Jahangirian E, Hamblin MR, Mirzaei H, Tarrahimofrad H, & Alikowsarzadeh N. 2025. Proteases, a powerful biochemical tool in the service of medicine, clinical and pharmaceutical. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 55(1), 1–25. <https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2364234>.

- Jarocki VM, Tacchi JL, & Djordjevic SP. 2015. Non-proteolytic functions of microbial proteases increase pathological complexity. *Proteomics*, 15(5–6), 1075–1088. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400386>.
- Jayadev A, & Lekshmi M. 2016. Screening and Isolation of Protease producing Marine Bacteria. *Emergent Life Sciences Research*, 2(2), 1–6. http://www.emergentresearch.org/abstract.php?article_id=1811.
- Jeanson S, Floury J, Gagnaire V, Lortal S, & Thierry A. 2015. Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>.
- Jeong SW, Yang JE, & Choi YJ. 2022. Isolation and Characterization of a Yellow Xanthophyll. *Korean Journal of Microbiology*, 58(3), 201–208. <https://doi.org/10.7845/kjm.2022.2027>.
- Jin Q, & Kirk MF. 2018. pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 21. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>.
- Johnson T, Richards GP, Jacobs J, Townsend H, Almuhaideb E, Rosales D, Chigbu P, Dasilva L, & Parveen S. 2025. Prevalence and pathogenic potential of *Shewanella* species in oysters and seawater collected from the Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1502443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1502443>.
- Kabense R, Ginting EL, Wullur S, Kawung NJ, Losung F, & Tombokan JL. 2019. Screening of the Proteolytic Bacteria Symbiont with *Algae gracillaria* sp. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(2), 421–427. <https://doi.org/10.35800/jip.7.2.2019.24487>.
- Kabir MF, & Ju L-K. 2023. On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry*, 130, 734–746. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031>.
- Kang S, Niu J, Zhang Q, Zhang X, Han G, & Zhao M. 2020. Niche differentiation is the underlying mechanism maintaining the relationship between community diversity and stability under grazing pressure. *Global Ecology and Conservation*, 24, e01246. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01246>.
- Khan MF. 2025. Enhancing stability of enzymes for industrial applications: molecular insights and emerging approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 362. <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04568-4>.
- Knapp BD, Willis L, Gonzalez C, Vashistha H, Jammal-Touma J, Tikhonov M, Ram J, Salman H, Elias JE, & Huang KC. 2025. Metabolic rearrangement enables adaptation of microbial growth rate to temperature shifts. *Nature Microbiology*, 10(1), 185–201. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01841-4>.

- Kotb E, Alabdalall AH, Alsayed MA, Alghamdi AI, Alkhaldi E, AbdulAzeez S, & Borgio JF. 2023. Isolation, Screening, and Identification of Alkaline Protease-Producing Bacteria and Application of the Most Potent Enzyme from *Bacillus* sp. Mar64. Fermentation, 9(7), 637. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070637>.
- Kumar J, Kaushal G, & Singh SP. 2020. Chapter 6 - Enzyme engineering strategies for catalytic activity in wide pH range. In SP Singh, A Pandey, RR Singhania, C Larroche, & Z Li (Eds.), Biomass, Biofuels, Biochemicals (pp. 91–101). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819820-9.00006-5>.
- Kuppan N, Padman M, Mahadeva M, Srinivasan S, & Devarajan R. 2024. A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. Waste Management Bulletin, 2(3), 154–171. <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.07.005>.
- Kusumaningrum A, Wayan Gunam IB, & Mahaputra Wijaya IM. 2019. Optimasi Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Endoglukanase Menggunakan Response Surface Methodology (RSM). Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri, 7(2), 243–252. <https://doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i02.p08>.
- Kuznetsova OV, & Timerbaev AR. 2022. Marine sediment analysis – A review of advanced approaches and practices focused on contaminants. Analytica Chimica Acta, 1209, 339640. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339640>.
- Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, & Raoult D. 2015. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews, 28(1), 208–236. <https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>.
- Lee KK, Yu SR, Chen FR, Yang TI, & Liu PC. 2000. Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. Journal of Applied Microbiology, 88(2), 284–290. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00958.x>.
- Lehman D. 2000. Triple Sugar Iron Agar. American Society for Microbiology, 2–3. <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254458.pdf>.
- Liu H, Wang S, Wang J, Guo X, Song Y, Fu K, Gao Z, Liu D, He W, & Yang L-L. 2025. Energy metabolism in health and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy, 10(1), 69. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02141-x>.
- Liu Q, Wang J, Li X-J, Meng N, Yang G-P, Zhang G, & Zhuang G-C. 2025. Regulation and response of heterotrophic bacterial production to environmental changes in marginal seas of the Western Pacific Ocean. Global and Planetary Change, 245, 104678. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2024.104678>.
- López-García P, Zivanovic Y, Deschamps P, & Moreira D. 2015. Bacterial gene import and mesophilic adaptation in archaea. Nature Reviews Microbiology, 13(7), 447–456. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3485>.

- López-Trujillo J, Mellado-Bosque M, Ascacio-Valdés JA, Prado-Barragán LA, Hernández-Herrera JA, & Aguilera-Carbó AF. 2023. Temperature and pH Optimization for Protease Production Fermented by *Yarrowia lipolytica* from Agro-Industrial Waste. *Fermentation*, 9(9), 819. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090819>.
- Lund PA, De Biase D, Liran O, Scheler O, Mira NP, Cetecioglu Z, Fernández EN, Bover-Cid S, Hall R, Sauer M, & O'Byrne C. 2020. Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 556140. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140>.
- Lyubetsky VA, Zverkov OA, Rubanov LI, & Seliverstov AV. 2020. Optimal Growth Temperature and Intergenic Distances in Bacteria, Archaea, and Plastids of Rhodophytic Branch. *BioMed Research International*, 2020, 3465380. <https://doi.org/10.1155/2020/3465380>.
- Mahmoud A, Kotb E, Alqosaibi AI, Al-Karmalawy AA, Al-Dhuayan IS, & Alabkari H. 2021. *In vitro* and *in silico* characterization of alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* D9 recovered from Saudi Arabia. *Heliyon*, 7(10), e08148. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08148>.
- Majeed T, Lee CC, Orts WJ, Tabassum R, Shah TA, Jordan YAB, Dawoud TM, & Bourhia M. 2024. Characterization of a thermostable protease from *Bacillus subtilis* BSP strain. *BMC Biotechnology*, 24(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00870-5>.
- Malik S, Muhammad K, & Waheed Y. 2024. Artificial intelligence and industrial applications revolution in modern industries. *Ain Shams Engineering Journal*, 15(9), 102886. <https://doi.org/10.1016/j.asej.2024.102886>.
- Mallick S, & Das S. 2023. Acid-tolerant bacteria and prospects in industrial and environmental applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(11), 3355–3374. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12529-w>.
- Mao S, Jiang J, Xiong K, Chen Y, Yao Y, Liu L, Liu H, & Li X. 2024. Enzyme Engineering: Performance Optimization, Novel Sources, and Applications in the Food Industry. *Foods*, 13(10), 1538. <https://doi.org/10.3390/foods13101538>.
- Martini KM, Boddu SS, Nemenman I, & Vega NM. 2024. Maximum likelihood estimators for colony-forming units. *Microbiology Spectrum*, 12(9), e03946-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03946-23>.
- Masi C, Gemechu G, & Tafesse M. 2021. Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent. *Annals of Microbiology*, 71(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01631-x>.
- Matkawala F, Nighojkar S, Kumar A, & Nighojkar A. 2021. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03036-z>.

- Maurer K-H. 2024. Enzymes in Detergents and Cleaning Agents. In K-E Jaeger, A Liese, & C Syldatk (Eds.), *Introduction to Enzyme Technology* (pp. 361–383). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6_17.
- Maurya DK, Kumar A, Chaurasiya U, Hussain T, & Singh SK. 2021. 11 - Modern era of microbial biotechnology: opportunities and prospects. In MK Solanki, PL Kashyap, RA Ansari, & B Kumari (Eds.), *Microbiomes and Plant Health* (pp. 317–343). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819715-8.00011-2>.
- McConn BR, Kraft AL, Durso LM, Ibekwe AM, Frye JG, Wells JE, Tobey EM, Ritchie S, Williams CF, Cook KL, & Sharma M. 2024. An analysis of culture-based methods used for the detection and isolation of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus spp.* from surface water: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 927, 172190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172190>.
- McGrath C. 2023. Breaking Genetic Barriers: Understanding the Limits of Horizontal Gene Transfer. *Genome Biology and Evolution*, 15(6), evad102. <https://doi.org/10.1093/gbe/evad102>.
- Meghwanshi GK, Kaur N, Verma S, Dabi NK, Vashishtha A, Charan PD, Purohit P, Bhandari HS, Bhojak N, & Kumar R. 2020. Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(4), 586–601. <https://doi.org/10.1002/bab.1919>.
- Menéndez-Serra M, Cáliz J, Triadó-Margarit X, Alonso D, & Casamayor EO. 2024. Selective Pressure Influences Inter-Biome Dispersal in the Assembly of Saline Microbial Communities. *Environmental Microbiology*, 26(12), e70019. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.70019>.
- Mochd Y. 2014. Peranan Isolat Bakteri Indigenous Sebagai Agen Bioremediasi Perairan Yang Terkontaminasi Uranium. *Ganendra Journal of Nuclear Science and Technology*, 17(1), 35–44. <https://doi.org/10.17146/gnd.2014.17.1.2040>.
- Mokashe N, Chaudhari B, & Patil U. 2018. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 493–522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.217>.
- Mondal H, & Thomas J. 2022. Isolation and Characterization of a Novel Actinomycete Isolated from Marine Sediments and Its Antibacterial Activity against Fish Pathogens. *Antibiotics*, 11(11), 1546. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111546>.
- Moon S, Ham S, Jeong J, Ku H, Kim H, & Lee C. 2023. Temperature Matters: Bacterial Response to Temperature Change. *Journal of Microbiology*, 61(3), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s12275-023-00031-x>.

- Moran MA, Kujawinski EB, Schroer WF, Amin SA, Bates NR, Bertrand EM, Braakman R, Brown CT, Covert MW, Doney SC, Dyhrman ST, Edison AS, Eren AM, Levine NM, Li L, Ross AC, Saito MA, Santoro AE, Segrè D, & Vardi A. 2022. Microbial metabolites in the marine carbon cycle. *Nature Microbiology*, 7(4), 508–523. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01090-3>.
- Mu D-S, Ouyang Y, Chen G-J, & Du Z-J. 2021. Strategies for culturing active/dormant marine microbes. *Marine Life Science & Technology*, 3(2), 121–131. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00053-z>.
- Natsir H, Ahmad A, Massi N, Taba P, Anita, & Rauf W. 2024. Isolation, Production of Protease, and Antimicrobial Activities from Marine Sediment Gamma-Proteobacteria of MBS-L3 Isolate. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 17(6), 2855–2862. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2024.00448>.
- Ndochinwa GO, Wang QY, Okoro NO, Amadi OC, Nwagu TN, Nnamchi CI, Moneke AN, & Odiba AS. 2024. New advances in protein engineering for industrial applications: Key takeaways. *Open Life Sciences*, 19(1), 20220856. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0856>.
- Nur Jannah S, Hanifa YR, Utomo AB, Dian Prambodo AK, & Lunggani AT. 2021. Isolasi dan Potensi Enzim Hidrolase Bakteri Simbion *Padina sp.* dari Pantai Lengkuas Belitung. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 23(1), 11–17. <https://doi.org/10.14710/bioma.23.1.11-17>.
- O'Connor JA, Erler DV, Ferguson A, & Maher DT. 2022. The tidal freshwater river zone: Physical properties and biogeochemical contribution to estuarine hypoxia and acidification - The hydrologic switch. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 268, 107786. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2022.107786>.
- Ogodo AC, Agwaranze DI, Daji M, & Aso RE. 2022. Chapter 13 - Microbial techniques and methods: basic techniques and microscopy. In C Egbuna, KC Patrick-Iwuanyanwu, MA Shah, JC Ifemeje, & A Rasul (Eds.), *Analytical Techniques in Biosciences* (pp. 201–220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00003-8>.
- Oliveira-Silva R, Sousa-Jerónimo M, Botequim D, Silva NJO, Paulo PMR, & Prazeres DMF. 2020. Monitoring Proteolytic Activity in Real Time: A New World of Opportunities for Biosensors. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(7), 604–618. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.03.011>.
- Pajares S, & Ramos R. 2019. Processes and Microorganisms Involved in the Marine Nitrogen Cycle: Knowledge and Gaps. *Frontiers in Marine Science*, 6, 739. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00739>.
- Pamaya D. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protase pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 48 Jam dan Identifikasi Molekuler Bakteri Berbasis Analisis Gen 16S rRNA. *Skripsi, Universitas Jember*, 7–21.

- Park KC, Dharmasivam M, & Richardson DR. 2020. The Role of Extracellular Proteases in Tumor Progression and the Development of Innovative Metal Ion Chelators that Inhibit their Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6805. <https://doi.org/10.3390/ijms21186805>.
- Pati S, Banerjee S, Sengupta A, Sarma J, Shaheen S, Tenguria S, & Kumar A. 2023. Chapter 16 - Adaptation strategies of thermophilic microbes. In A Kumar & S Tenguria (Eds.), *Bacterial Survival in the Hostile Environment* (pp. 231–249). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91806-0.00012-6>.
- Patra JK, Das G, Das SK, & Thatoi H. 2020. Isolation, Culture, and Biochemical Characterization of Microbes. In *A Practical Guide to Environmental Biotechnology* (pp. 83–133). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6252-5_4.
- Patricia Shields, & Cathcart L. 2011. Motility Test Medium Protocol. *American Society for Microbiology*, 1–7.
- Philipps-Wiemann P. 2018. Chapter 13 - Proteases—human food. In CS Nunes & V Kumar (Eds.), *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (pp. 267–277). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00013-7>.
- Pinhassi J, Farnelid H, García SM, Teira E, Galand PE, Obernosterer I, Quince C, Vila-Costa M, Gasol JM, Lundin D, Andersson AF, Labrenz M, & Riemann L. 2022. Functional responses of key marine bacteria to environmental change – toward genetic counselling for coastal waters. *Frontiers in Microbiology*, 13, 869093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869093>.
- Pokhrel AR, Steinbach G, Krueger A, Day TC, Tijani J, Bravo P, Ng SL, Hammer BK, & Yunker PJ. 2024. The biophysical basis of bacterial colony growth. *Nature Physics*, 20(9), 1509–1517. <https://doi.org/10.1038/s41567-024-02572-3>.
- Poli A, Finore I, Romano I, Gioiello A, Lama L, & Nicolaus B. 2017. Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. *Microorganisms*, 5(2), 25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020025>.
- Porter R, Trenado-Yuste C, Martinez-Calvo A, Su M, Wingreen NS, Datta SS, & Huang KC. 2025. On the growth and form of bacterial colonies. *Nature Reviews Physics*, 7(10), 535–553. <https://doi.org/10.1038/s42254-025-00849-x>.
- Qiu Y, Zhou Y, Chang Y, Liang X, Zhang H, Lin X, Qing K, Zhou X, & Luo Z. 2022. The Effects of Ventilation, Humidity, and Temperature on Bacterial Growth and Bacterial Genera Distribution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(22), 15345. <https://doi.org/10.3390/ijerph192215345>.
- Rahman A, Jahanara I, & Jolly YN. 2021. Assessment of physicochemical properties of water and their seasonal variation in an urban river in Bangladesh. *Water Science and Engineering*, 14(2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.wse.2021.06.006>.

- Rakaz MA, Hussien MO, & Ibrahim HM. 2021. Isolation, Extraction, Purification, and Molecular Characterization for Thermostable α -Amylase from Locally Isolated *Bacillus* Species in Sudan. *Biochemistry Research International*, 2021, 6670380. <https://doi.org/10.1155/2021/6670380>.
- Rathod BG, Poosarla VG, Kuppili SK, Chouhan KSYR, & Shivshetty N. 2024. Production and characterization of a halotolerant protease from *Bacillus siamensis* F2 for chicken byproducts valorization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(1), 1343–1358. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05226-1>.
- Rayalu MB, Vijayakumar M, & Rao MP. 2024. Innovations in biotechnology: Recent advances and future directions. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 6(3), 45–52. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v6.i3a.177>.
- Razmi N, Lazouskaya M, Pajcin I, Petrovic B, Grahovac J, Simic M, Willander M, Nur O, & Stojanovic GM. 2023. Monitoring the effect of pH on the growth of pathogenic bacteria using electrical impedance spectroscopy. *Results in Engineering*, 20, 101425. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101425>.
- Reiner K. 2012. Carbohydrate Fermentation Protocol. *American Society for Microbiology*, 1–10.
- Ren Y, Liu R, Zheng Y, Wang H, Meng Q, Zhu T, Yin J, Cao X, & Yu Z. 2024. Biosynthetic mechanism of the yellow pigments in the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain T1lg65. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(2), e01779-23. <https://doi.org/10.1128/aem.01779-23>.
- Reynolds J. 2005. Serial Dilution Protocols. *American Society For Microbiology*, 1–7. www.asmscience.org.
- Riesch R, Plath M, & Bierbach D. 2018. Ecology and evolution along environmental gradients. *Current Zoology*, 64(2), 193–196. <https://doi.org/10.1093/cz/zoy015>.
- Rigoldi F, Donini S, Redaelli A, Parisini E, & Gautieri A. 2018. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2(1), 011501. <https://doi.org/10.1063/1.4997367>
- Robinson PK. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
- Rodrigues CJC, & de Carvalho CCCR. 2022a. Cultivating marine bacteria under laboratory conditions: Overcoming the unculturable dogma. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 964589. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.964589>.
- Rodrigues CJC, & de Carvalho CCCR. 2022b. Marine Bioprospecting, Biocatalysis and Process Development. *Microorganisms*, 10(10), 1965. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101965>.
- Rong S, Fu-Liang Q, Yi-Ting C, Fa-Ping Z, Wei D, Ya-Xian L, Zhi-Pang H, Xiao-Yan Y, & Wen X. 2023. Soil sampling methods for microbial study in montane regions. *Global Ecology and Conservation*, 47, e02679. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02679>.

- Roy ED, Porterfield KK, & Chin TL. 2025. Navigating the Four C's of Nutrient Recycling to Support More Circular Economies. *ACS Sustainable Resource Management*, 2(9), 1623–1626. <https://doi.org/10.1021/acssusresmgt.5c00370>.
- Saelens G, & Houf K. 2022. Systematic review and critical reflection on the isolation and identification methods for spoilage associated bacteria in fresh marine fish. *Journal of Microbiological Methods*, 203, 106599. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106599>.
- Salas-Bruggink DIJ, Martín JSS, Leiva G, & Blamey JM. 2024. Extremozymes: Challenges and opportunities on the road to novel enzymes production. *Process Biochemistry*, 143, 323–336. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.06.012>.
- Scheuerl T, Hopkins M, Nowell RW, Rivett DW, Barraclough TG, & Bell T. 2020. Bacterial adaptation is constrained in complex communities. *Nature Communications*, 11(1), 754. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14570-z>.
- Sebastian PM, Sanjana G, Mundrikeri D, & Rao KVB. 2025. Optimization and Purification of Protease Produced by *Rosellomorea aquimaris* Isolated from Marine Sediments and Exploring Their Diverse Biological Applications. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 61(4), 680–690. <https://doi.org/10.1134/S0003683824607352>.
- Senaratne WM, & Jayaweera S. 2024. Comparison of microbial preservation methods: a narrative review. *Germes*, 14(4), 375–386. <https://doi.org/10.18683/germs.2024.1447>.
- Shankar R, Upadhyay PK, & Kumar M. 2021. Protease Enzymes: Highlights on Potential of Proteases as Therapeutics Agents. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(2), 1281–1296. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10167-2>.
- Sharma KM, Kumar R, Panwar S, & Kumar A. 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>.
- Sharma N, Sharma S, Sharma P, & Devi B. 2023. Chapter 3 - Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms. In AK Bhatt, RK Bhatia, & TC Bhalla (Eds.), *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 47–84). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00003-9>.
- Sharp JL, Parker AE, & Hamilton MA. 2023. Calculating the limit of detection for a dilution series. *Journal of Microbiological Methods*, 208, 106723. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106723>.
- Shekhar C, Anon A, Anon A, & Anon A. 2025. Molecular Identification Techniques of Bacteria: A Review. *SSRN Electronic Journal*, 4(5), 388–393. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5134717>.

- Shu WS, & Huang LN. 2022. Microbial diversity in extreme environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 219–235. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00648-y>.
- Siddikey F, Jahan MI, Hormoni HMT, Nishi NJ, Hasan SMK, Rahman N, Al Faik MA, & Hossain MA. 2025. Enzyme Technology in the Food Industry: Molecular Mechanisms, Applications, and Sustainable Innovations. *Food Science & Nutrition*, 13(9), e70927. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70927>.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, & Mehta PK. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.
- Sirajuddin H, Kaharuddin, & Sultan. 2020. Sediment Profiles and Distribution of Losari beach Ujungpandang District Makassar City. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 875(1), 012054. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/875/1/012054>.
- Solanki P, Putatunda C, Kumar A, Bhatia R, & Walia A. 2021. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, 11(10), 428. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>.
- Song P, Zhang X, Wang S, Xu W, Wang F, Fu R, & Wei F. 2023. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1236368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>.
- Sousa AM, Machado I, Nicolau A, & Pereira MO. 2013. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>.
- Stan-Lotter H, & Fendrihan S. 2017. Adaption of microbial life to environmental extremes: Novel research results and application, second edition. Springer International Publishing, 1–342. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48327-6>.
- Štanfel D, Kalogjera L, Ryazantsev SV, Hlača K, Radtsig EY, Teimuraz R, & Hrabač P. 2022. The Role of Seawater and Saline Solutions in Treatment of Upper Respiratory Conditions. *Marine Drugs*, 20(5), 330. <https://doi.org/10.3390/md20050330>.
- Stubbendieck RM, & Straight PD. 2016. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *Journal of Bacteriology*, 198(16), 2145–2155. <https://doi.org/10.1128/JB.00275-16>.
- Sujitha P, & Shanthi C. 2023. Importance of enzyme specificity and stability for the application of proteases in greener industrial processing- a review. *Journal of Cleaner Production*, 425, 138915. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138915>.
- Sultana R, & Joseph I. 2024. Marine protease-producing bacteria as potential probiotics for advancing mariculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 61, 103392. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103392>.

- Syafrizal RR, Partono T, Zulkifliani KO, Ardhyarini N, Handayani Y, & Rofiqoh. 2020. Biodegradasi Senyawa Hidrokarbon Minyak Bumi Menggunakan Aktivitas Konsorsium Sedimen Laut Dalam. *Lembaran Publikasi Minyak Dan Gas Bumi*, 54(2), 81–91. <https://doi.org/10.29017/LPMGB.54.2.484>.
- Thallapureddy S, Sherratt F, Hallowell M, & Bhandari S. 2024. Effective information collection in incident investigations: A systematic review and narrative synthesis. *Safety Science*, 171, 106404. <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2023.106404>.
- Thiagarajan C, & Devarajan Y. 2025. The urgent challenge of ocean pollution: Impacts on marine biodiversity and human health. *Regional Studies in Marine Science*, 81, 103995. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2024.103995>.
- Thongsongkaew C, Cheirsilp B, Billateh A, Maneechote W, & Srinuanpan S. 2025. Screening of proteolytic, amylolytic, and lipolytic bacteria and their consortia for concomitant production of hydrolytic enzymes and bioremediation of shrimp pond sludge. *Electronic Journal of Biotechnology*, 77, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2025.05.005>.
- Trikurniadewi N. 2025. Isolasi dan Karakterisasi Mikroba Indigenus Penghasil Biosurfaktan dari Eco-enzyme. *Jurnal Kesehatan Vokasional*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.22146/jkesvo.101533>.
- Trinh KTL, & Lee NY. 2022. Recent Methods for the Viability Assessment of Bacterial Pathogens: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Pathogens*, 11(9), 1057. <https://doi.org/10.3390/pathogens11091057>.
- Tsai JM, Nowak RP, Ebert BL, & Fischer ES. 2024. Targeted protein degradation: from mechanisms to clinic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(9), 740–757. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00729-9>.
- Tuit CB, & Wait AD. 2020. A review of marine sediment sampling methods. *Environmental Forensics*, 21(3–4), 291–309. <https://doi.org/10.1080/15275922.2020.1771630>.
- Virgo M, Mostowy S, & Ho BT. 2025. Emerging models to study competitive interactions within bacterial communities. *Trends in Microbiology*, 33(6), 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.12.009>.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, & Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- Wael D, El-Amier Y, Saber WIA, & Elsayed A. 2024. Plant-associated halotolerant bacteria improving growth of *Vicia faba* L. Mariout-2 under salinity conditions. *Scientific Reports*, 14(1), 16737. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66504-0>.
- Wang BR, Zhi WX, Han SY, Zhao HF, Liu YX, Xu SY, Zhang YH, & Mu ZS. 2024. Adaptability to the environment of protease by secondary structure changes and application to enzyme-selective hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 278, 134969. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134969>.

- Wang C, Morrissey EM, Mau RL, Hayer M, Piñeiro J, Mack MC, Marks JC, Bell SL, Miller SN, Schwartz E, Dijkstra P, Koch BJ, Stone BW, Purcell AM, Blazewicz SJ, Hofmockel KS, Pett-Ridge J, & Hungate BA. 2021. The temperature sensitivity of soil: microbial biodiversity, growth, and carbon mineralization. *The ISME Journal*, 15(9), 2738–2747. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00959-1>.
- Wuwung L, McIlgorm A, & Voyer M. 2024. Sustainable ocean development policies in Indonesia: paving the pathways towards a maritime destiny. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1449871. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1449871>.
- Yun J, Cui Y, Wang R, Zang Y, Liu J, Zhao Y, Rui J, Chen X, & Li X. 2024. The complete genome sequence of proteases-producing *Shewanella* sp. H8 isolated from Antarctica. *Genomics Data*, 40, 100655. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2024.100655>.
- Xiong L, Cao Y, Cooper R, Rappel WJ, Hasty J, & Tsimring L. 2020. Flower-like patterns in multi-species bacterial colonies. *eLife*, 9, e48885. <https://doi.org/10.7554/eLife.48885>.
- Xu K, Fu H, Chen Q, Sun R, Li R, Zhao X, Zhou J, & Wang X. 2025. Engineering thermostability of industrial enzymes for enhanced application performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 291, 139067. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139067>.
- Xu W, Xu Y, Sun R, Rey Redondo E, Leung KK, Wan SH, Li J, & Yung CCM. 2024. Revealing the intricate temporal dynamics and adaptive responses of prokaryotic and eukaryotic microbes in the coastal South China Sea. *Science of The Total Environment*, 952, 176019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176019>.
- Yagami T, Yamamoto Y, & Koma H. 2019. Pathophysiological Roles of Intracellular Proteases in Neuronal Development and Neurological Diseases. *Molecular Neurobiology*, 56(5), 3090–3112. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1277-4>.
- Yan X, Liu X, Zhao C, & Chen G-Q. 2023. Applications of synthetic biology in medical and pharmaceutical fields. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01440-5>.
- Yao H, Liu S, Liu T, Ren D, Yang Q, Zhou Z, & Mao J. 2023. Screening of marine sediment-derived microorganisms and their bioactive metabolites: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(7), 172. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03621-4>.
- Yu H, Wang C, Phuntsho S, He T, Naidu G, ination brine using Li₂TiO₃ membrane-coated capacitive deionization. *Water Research*, 285, 124113. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2025.124113>.
- Yu S, Yang H, Li T, Pan H, Ren S, Luo G, Jiang J, Yu L, Chen B, Zhang Y, Wang S, Tian R, Zhang T, Zhang S, Chen Y, Yuan Q, Ge S, Zhang J, & Xia N. 2021. Efficient intracellular delivery of proteins by a multifunctional chimaeric peptide in vitro and in vivo. *Nature Communications*, 12(1), 5131. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25448-z>.

- Yusal MS, Marfai MA, Hadisusanto S, & Khakim N. 2019. The Ecological Analysis of Meiofauna as a Water Quality Bioindicator in the Coast of Losari Beach, Makassar. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 256(1), 012024. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/256/1/012024>.
- Zhang J, Chen M, Huang J, Guo X, Zhang Y, Liu D, Wu R, He H, & Wang J. 2019. Diversity of the microbial community and cultivable protease-producing bacteria in the sediments of the Bohai Sea, Yellow Sea, and South China Sea. PLoS ONE, 14(4), e0215328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215328>.
- Zhang K, & Han Y. 2024. Thermostable Bacterial Collagenolytic Proteases: A Review. Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(7), 1385–1394. <https://doi.org/10.4014/jmb.2404.04051>.
- Zhou Z, Tran PQ, Kieft K, & Anantharaman K. 2020. Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation. The ISME Journal, 14(8), 2060–2077. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0669-4>.
- Han DS, & Shon HK. 2025. Highly selective lithium recovery from seawater
- Zhou D, Yan X, Qu F, Wang L, Zhang Y, & Hou Z. 2009. Role of alkaline serine protease, asp, in *Vibrio alginolyticus* virulence and regulation of its expression by luxO-luxR regulatory system. Journal of Bacteriology, 191(15), 4860-4868. <https://doi.org/10.1128/JB.00232-09>.

BAB III

ISOLASI, PRODUKSI, PURIFIKASI, DAN KARAKTERISASI PROTEASE *Shewanella algae*

3.1 Abstrak

Protease merupakan biokatalis penting dengan aplikasi luas dalam industri bioteknologi, farmasi, dan pangan. **Tujuan:** mengoptimalkan produksi, mengkarakterisasi kondisi optimum, dan memurnikan protease dari bakteri laut *Shewanella algae*. **Metode:** produksi protease dilakukan melalui kultivasi dengan monitoring pertumbuhan (OD) dan aktivitas enzim setiap 12 jam selama 96 jam. Karakterisasi meliputi penentuan pH optimum (pH 4–9), suhu optimum (30–45°C), konsentrasi substrat (0,25–2,0%), dan pengaruh ion logam (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Na^{+} , Zn^{2+}) pada konsentrasi 1 mM, 10 mM dan 20 mM. Pemurnian dilakukan melalui fraksinasi amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi gel filtrasi Sephadex G-75, diikuti analisis SDS-PAGE untuk penentuan berat molekul. **Hasil:** menunjukkan produksi optimum pada jam ke-48 dengan aktivitas spesifik 0,458 U/mL (fase eksponensial, OD 0,82). Protease bekerja optimal pada pH 7 (0,2865 U/mL) dan suhu 37°C (0,2863 U/mL), mengkonfirmasi sifat neutral protease mesofilik. Kejenuhan substrat terjadi pada konsentrasi 1,0% (0,2386 U/mL). Ion Ba^{2+} , yang merupakan aktivator, diikuti oleh Mg^{2+} dan K^{+} sebagai aktivator moderat, sedangkan Ca^{2+} dan Zn^{2+} cenderung bersifat inhibitor. Fraksinasi menghasilkan fraksi F3 (40–60% saturasi) dengan aktivitas spesifik 2,20 U/mg. Dialisis meningkatkan kemurnian 5,72 kali lipat (aktivitas spesifik 39,93 U/mg, yield 31,01%). Kromatografi Sephadex G-75 menghasilkan fraksi F12 dengan aktivitas spesifik 207 U/mg dan peningkatan kemurnian 29,64 kali lipat (yield 14,05%). SDS-PAGE menunjukkan berat molekul 75 kDa ($R^2 = 0,9846$). **Kesimpulan:** protease *Shewanella algae* merupakan neutral protease mesofilik dengan potensi aplikasi industri yang tinggi.

Kata kunci: Ion logam, karakterisasi enzim, protease, SDS-PAGE, Sephadex G-75, *Shewanella algae*

3.2 Pendahuluan

Suatu reaksi kimia, khususnya yang melibatkan senyawa organik di laboratorium, membutuhkan kondisi tertentu agar dapat berlangsung dengan baik. Kondisi tersebut ditentukan oleh berbagai faktor seperti suhu, tekanan, waktu, konsentrasi reaktan, serta keberadaan katalis atau pelarut yang sesuai (Sin et al., 2025). Apabila salah satu dari faktor tersebut tidak sesuai dengan kebutuhan reaksi, maka reaksi tidak dapat berlangsung secara optimal, bahkan bisa jadi gagal sepenuhnya. Tubuh manusia dapat dianalogikan sebagai sebuah laboratorium yang sangat kompleks, karena di dalamnya terjadi berbagai macam reaksi kimia yang sangat beragam dan terorganisasi dengan baik (Billman, 2020; Wysiadecki et al., 2024).

Berbagai reaksi biokimia penting berlangsung dalam tubuh, meliputi degradasi zat gizi dari makanan melalui proses pencernaan, penggunaan hasil degradasi untuk memproduksi energi yang diperlukan sel, serta sintesis kembali molekul-molekul hasil degradasi menjadi cadangan makanan atau biomolekul baru (Pandey, 2024; Schauenburg & Weil, 2024). Banyak reaksi lain yang apabila dilakukan di luar tubuh atau secara *in vitro* di laboratorium memerlukan keterampilan khusus, kondisi yang terkontrol secara ketat, serta waktu yang cukup lama untuk dapat berlangsung. Reaksi-reaksi tersebut di dalam tubuh atau secara *in vivo* dapat berjalan dengan baik meskipun tanpa memerlukan suhu tinggi dan bahkan berlangsung dalam waktu relatif singkat (Hirsch & Schildknecht, 2019; Saeidnia et al., 2015).

Kecepatan dan efisiensi reaksi biokimia dalam tubuh ini dimungkinkan oleh adanya katalis biologis yang disebut enzim. Enzim bekerja menurunkan energi aktivasi reaksi sehingga memungkinkan reaksi berlangsung lebih cepat pada kondisi fisiologis normal, seperti suhu tubuh yang hanya sekitar 37°C. Dengan demikian, enzim merupakan faktor kunci yang membuat sistem metabolisme tubuh dapat berjalan efektif (Robinson, 2015).

Enzim sendiri merupakan molekul protein yang jumlahnya sangat dominan di dalam sel. Bahkan, sebagian besar total protein dalam sel tersusun oleh enzim yang berperan dalam berbagai reaksi metabolisme penting (Morris et al., 2022). Diperkirakan, satu sel dapat memuat hingga sekitar 2.000 jenis molekul enzim yang berbeda, dengan fungsi spesifik masing-masing dalam mengatur jalannya reaksi kimia tertentu (Cui et al., 2025; Robinson, 2015).

Enzim berperan sebagai biokatalisator yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi kimia tanpa mengalami perubahan struktur atau terkonsumsi dalam proses reaksi. Peran enzim terbatas sebagai fasilitator yang memfasilitasi pertemuan molekul substrat dan mempercepat transformasi substrat menjadi produk, kemudian setelah proses reaksi berakhir, enzim kembali pada struktur awalnya sehingga dapat berfungsi kembali (Bilal et al., 2019; Buller et al., 2023; Burek et al., 2022). Sifat ini menjadikan enzim sangat efisien karena dapat digunakan secara berulang.

Fungsi enzim adalah mengubah substrat tertentu menjadi produk dengan struktur molekul yang berbeda. Setiap enzim memiliki kekhususan substrat, artinya enzim hanya bekerja pada substrat tertentu saja (Akhtar & Wright, 2022; Guengerich & Yoshimoto, 2018). Enzim dikenal sebagai protein katalitik yang sangat spesifik dan berperan dalam reaksi-reaksi kimia dalam sistem biologis (Borkakoti et al., 2025; Elshad et al., 2024).

Enzim sebagai katalis memiliki beberapa ciri penting yaitu enzim tidak diubah atau habis oleh reaksi yang dikatalisisnya. Enzim tidak menggeser posisi kesetimbangan kimia suatu reaksi; enzim hanya mempercepat tercapainya keadaan setimbang. Enzim mampu mempercepat laju reaksi dengan sangat signifikan, meskipun tidak memengaruhi hasil akhir reaksi secara termodinamika (Farhan et al., 2025; Sheldon, 2020). Enzim menjadi faktor fundamental yang memungkinkan kehidupan berlangsung melalui berbagai reaksi biokimia yang kompleks namun efisien (Albayati et al., 2024).

3.3 Metode penelitian

3.3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2023 - Maret 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Ilmu Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

3.3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf (Hirayama), inkubator (Memmert), enkas, bunsen, ose bulat dan ose lurus, alat-alat gelas laboratorium (Pyrex), mikropipet (Gilson), tips steril (Axygen), batang pengaduk, spatula, aluminium foil, kertas label, plastik wrap/parafilm, shaker inkubator (Lab Companion), sentrifugasi pendingin (Thermo Scientific Sorvall), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), pH meter (Thermo Orion dan Hanna Instruments), vortex mixer (Thermo Scientific), magnetic stirrer dengan hot plate (Heidolph), timbangan analitik (Ohaus), botol kultur steril (Corning), kolom kromatografi (Amicon), penangas air/waterbath (Memmert), freezer -20°C, lemari pendingin 4°C, kuvet kuartz (Sigma-Aldrich), stopwatch (Control Company), perangkat elektroforesis SDS-PAGE (Mini-PROTEAN), gel doc (Bio-Rad), termometer (Traceable), sarung tangan steril (Medline), masker, tissue steril, botol semprot, rak tabung, pensil kaca, marker permanen, dan tube mikro 1,5 mL dan 2 mL.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pepton (Merck dan Oxoid), yeast extract (Oxoid), bakto agar (Oxoid), skim milk powder (Oxoid), kasein (Sigma-Aldrich), glukosa (Sigma-Aldrich), besi(III) sitrat (Merck), NaCl (Merck dan Sigma-Aldrich), MgCl₂ (Sigma-Aldrich), Na₂SO₄ (Sigma-Aldrich), CaCl₂ (Sigma-Aldrich), KCl (Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), KBr (Sigma-Aldrich), SrCl₂ (Sigma-Aldrich), H₃BO₃ (Sigma-Aldrich), Na₂SiO₃ (Sigma-Aldrich), NaF (Sigma-Aldrich), NH₄NO₃ (Sigma-Aldrich), Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), (NH₄)₂SO₄ (Sigma-Aldrich), bufer Tris-HCl (Sigma-Aldrich), bufer fosfat (Sigma-Aldrich), bufer sitrat-fosfat pH 5,0–6,0 (Sigma-Aldrich), bufer glisin-NaOH pH 9,0–10,0 (Sigma-Aldrich), Sephadex G-75 (GE Healthcare/Cytiva), gliserol (Sigma-Aldrich), Bovine Serum Albumin/BSA (Sigma-Aldrich), membran dialisis (Sigma-Aldrich), asam trikloroasetat/TCA 10% (Merck), NaOH 0,5 M (Sigma-Aldrich), reagen Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), Na₂CO₃ (Merck), L-tirosin (Sigma-Aldrich), reagen Bradford (Bio-Rad), akrilamida dan bis-akrilamida (Bio-Rad), Tris basa (Sigma-Aldrich), natrium dodesil sulfat/SDS (Sigma-Aldrich), TEMED (Sigma-Aldrich), amonium persulfat/APS (Sigma-Aldrich), β-merkaptotetanol (Sigma-Aldrich), biru bromofenol (Sigma-Aldrich), penanda protein 10–250 kDa (Thermo Scientific PageRuler), bufer running Tris-glisin-SDS (Bio-Rad), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad), metanol (Merck), asam asetat (Merck), ZnSO₄ (Merck), FeSO₄ (Merck), MnCl₂ (Merck), CuSO₄ (Merck), HgCl₂ (Merck),

EDTA (Merck), PMSF (Sigma-Aldrich), iodoasetamida (Sigma-Aldrich), HCl (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), akuades steril, air laut steril, alkohol 70% dan 96% (Onemed), spiritus (Onemed), isolat bakteri terpilih, kertas saring Whatman (Advantec), parafilm (Bemis Parafilm M), dan sarung tangan lateks (Ansell).

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Pembuatan media inokulum

Isolat bakteri yang telah diremajakan diambil 2-3 ose dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi media inokulum steril, kemudian dikocok di dalam shaker inkubator pada suhu 37°C kecepatan agitasi 180 rpm selama 24 jam (Fasim et al., 2021; Shrestha & Chio, 2022). Adapun komposisi media inokulum dijabarkan pada **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Komposisi media inokulum

No.	Komponen	Jumlah (%)
1	Ammonium sulfate	0.7
2	Yeast ekstrak	0.05
3	Baktopepton	0.1
4	Glukosa	0.5
5	NaCl	0.1
6	K ₂ HPO ₄	0.01
7	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.01
8	CaCl ₂	0.05
9	Kasein	2

3.4.2 Penentuan waktu optimum pertumbuhan bakteri dan pengukuran *Optical Density* (OD)

Media inokulum aktif yang telah diproduksi selama 24 jam diambil sebanyak 10% lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi media produksi steril sebanyak 500 mL. Inkubasi dilakukan dengan shaker inkubator dengan kecepatan agitasi 180 rpm suhu 37°C selama 5 hari. Sampling dilakukan setiap 12 jam untuk mengukur *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Sampel disentrifugasi pada kecepatan agitasi 5000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit untuk memisahkan filtrat dan sel. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk mengukur aktivitas protease dan mengukur kadar protein menggunakan metode Lowry (Waterborg, 2009).

3.4.3 Produksi protease *Shewanella algae*

Isolat bakteri yang telah diremajakan diambil 2-3 ose dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi media inokulum steril. Kemudian dikocok di dalam shaker inkubator pada suhu 37°C kecepatan agitasi 180 rpm selama 24 jam.

Selanjutnya 10 % inokulum aktif dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL yang berisi media produksi steril dengan konsentrasi substrat kasein 2 %. Inkubasi dilakukan dengan shaker inkubator pada suhu 37°C kecepatan agitasi 180 rpm selama waktu optimum yang telah diperoleh sebelumnya. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan agitasi 10.000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit untuk memisahkan filtrat dan sel. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar protease, disimpan di dalam lemari es untuk proses pemurnian (Shaikh et al., 2023; Tennalli et al., 2022).

3.4.4 Pengukuran aktivitas protease

Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan metode Walter (Göbel et al., 2024; M. H, 2021). Ada tiga perlakuan yaitu blanko, standar dan sampel. Sebanyak 0,1 mL larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 mL kasein 2% b/v dan 0,5 mL buffer fosfat pH 7. Perlakuan pada blanko dan standar, enzim diganti dengan akuades dan tirosin 0,1 mM. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan cara penambahan 1 mL TCA (asam trikloroasetat) 0,1M. Pada blanko dan standar ditambahkan 0,1 mL akuades selanjutnya larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 0,75 mL supernatan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2,5 mL Na₂CO₃ 0,4 M kemudian ditambahkan 0,5 mL pereaksi folin Ciocalteau (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada λ maksimum 660 nm.

Aktivitas enzim proteolitik dapat dihitung dengan rumus:

$$UA = \frac{(Asp - Abl)}{(Ast - abl)} \times p \times 1/T$$

Keterangan:

UA = Unit aktivitas enzim

Asp = Nilai absorbansi sampel

Ast = Nilai absorbansi standart

Abl = Nilai absorbansi blanko

P = Faktor pengenceran

T = Waktu inkubasi

3.4.5 Pengukuran kadar protein

Penentuan kadar protein diukur dengan menggunakan metode Lowry dengan BSA sebagai larutan standar dan akuades sebagai larutan blanko (Waterborg, 2002). Sebanyak 1 mL protease ditambahkan 2,5 mL reagen lowry B dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex lalu dibiarkan selama 10 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 0,25 mL reagen lowry A, dihomogenkan dengan menggunakan vortex dan dibiarkan selama 30 menit sampai warna biru terbentuk.

Absorbannya diukur pada panjang gelombang maksimum BSA yang telah ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva standarnya untuk mendapatkan persamaan regresi.

3.4.6 Karakterisasi protease

Penentuan pH optimum. Campuran 200 μ L enzim, 200 μ L substrat, dan 200 μ L buffer sitrat 0,5 M dan buffer fosfat 0,5 M pada berbagai kisaran pH 4-9 dihomogenkan lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu optimum kemudian diambil sebanyak 200 μ L ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 800 μ L akuades dan ditambahkan 1 mL reagen follin, lalu ditutup dengan aluminium foil lalu dipanaskan hingga mendidih, disentrifugasi dan diukur aktivitas enzim pada setiap perubahan pH (Natsir, 2010; Sarni et al., 2015).

Penentuan suhu optimum. Campuran 200 μ L enzim, 200 μ L substrat dan 200 μ L buffer fosfat 0,1 M pH 7, dicampur dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu yang bervariasi (35-45°C) kemudian diambil sebanyak 200 μ L ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 800 μ L akuades dan ditambahkan 1 mL reagen follin, ditutup dengan aluminium foil lalu dipanaskan hingga mendidih, disentrifugasi dan diukur aktivitas enzim pada setiap perubahan suhu (Natsir, 2010; Sarni et al., 2015).

Pengaruh konsentrasi substrat. Campuran 200 μ L enzim, 200 μ L buffer optimum, dan 200 μ L 0.25 % hingga 2 % substrat dihomogenkan lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu dan pH optimum dengan konsentrasi substrat yang bervariasi, kemudian diambil sebanyak 200 μ L ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 800 μ L akuades dan ditambahkan 1 mL reagen follin, lalu ditutup dengan aluminium foil lalu dipanaskan hingga mendidih, disentrifugasi dan diukur aktivitas enzim yang diperoleh pada substrat untuk mendapatkan konsentrasi substrat optimum (Natsir, 2010; Sarni et al., 2015).

Pengaruh ion logam. Penentuan pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim menggunakan berbagai kation sebagai ion klorida termasuk kation divalent (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , dan Ba^{2+}), kation monovalent (Na^{+} dan K^{+}) dengan konsentrasi akhir 1 mM, 10 mM dan 50 mM. Sebanyak 200 μ L enzim, 200 μ L buffer pH optimum dan 200 μ L ion logam dicampurkan kemudian diinkubasi pada suhu optimum selama 30 menit. Kemudian ditambahkan substrat konsentrasi optimum lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu optimum selanjutnya diinaktivasi pada suhu 100°C. Sebanyak 200 μ L campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 800 μ L akuades dan ditambahkan 1 mL reagen follin, ditutup dengan aluminium foil lalu dipanaskan hingga mendidih, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C, dan diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum (Natsir, 2002; Zilda & Fawzya, 2006).

3.4.7 Pemurnian protease

Pemurnian dengan fraksinasi amonium sulfat. Filtrat yang merupakan ekstrak kasar isolat bakteri laut kemudian difraksinasi dengan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing 0- 20% (F1), 20-40% (F2), 40-60% (F3), 60-80% (F4), dan 80-100% (F5). Enzim ekstrak kasar yang diketahui volumenya ditambahkan dengan ammonium sulfat hingga kejenuhan F1 sedikit demi sedikit, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 4°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan agitasi 12.000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit. Filtrat hasil sentrifugasi sebelumnya kemudian ditambahkan lagi dengan ammonium-sulfat hingga kejenuhan F2 dan dilakukan cara yang sama dengan sebelumnya pada kejenuhan F3 hingga terdapat 5 fraksi ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda. Endapan kemudian dilarutkan dengan Tris-HCl 0,01 M pH 7. Masing-masing endapan yang terbentuk dilakukan pengukuran kadar protein dan aktivitas enzimnya. Fraksi yang memiliki kadar protein dan aktivitas enzim tertinggi dilanjutkan pada tahap pemurnian dialisis (Wingfield, 2001).

Pemurnian dengan dialisis menggunakan membran selofan. Penghilangan sisa garam dari molekul enzim hasil fraksinasi dilakukan dengan proses dialisis. Dialisis dilakukan pada masing-masing fraksi yang dimasukkan dalam membran selofan dengan dipastikan bahwa kantong selofan yang digunakan tidak bocor atau rusak. Selofan yang telah diisi dengan fraksi enzim dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer Tris-HCl 0,01 M, pH 7 lalu diaduk dengan pengaduk stirrer selama 10 jam pada suhu 4°C. Dialisis terus dilakukan sampai larutan buffer tidak keruh lagi saat ditambahkan BaCl₂ (Andrew et al., 2002). Fraksi enzim yang terbentuk dilakukan pengukuran kadar protein dan aktivitas enzimnya lalu dilanjutkan pada tahap pemurnian dengan kromatografi kolom Sephadex G-75.

Pemurnian dengan kromatografi kolom Sephadex G-75. Pemurnian dilanjutkan dengan kromatografi kolom Sephadex G-100 (1,5 x 40 cm) (Hazra & Saha Kesh, 2017). Sebanyak 1,0 g sephadex G-75 dilarutkan kedalam 100 mL akuades bebas ion steril dan dikembangkan semalam pada suhu 4°C. Selanjutnya maktris dicuci dengan buffer fosfat 0.05 M pH 7. Secara perlahan maktris sephadex G-75 dimasukkan kedalam kolom kromatografi berdiameter 1,5 cm dan tinggi 40 cm dan diusahakan tidak terjadi gelembung udara. Setelah bahan pendukung atau maktris terendapkan, dilakukan elusi dengan air bebas ion dan dilanjutkan elusi dengan buffer fosfat 0.05 M pH 7, hingga maktris bersih. Selanjutnya sampel (fraksi aktif dan hasil fraksi aktif butil sepharosa) dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan menggunakan pipet. Kecepatan alir eluen 1 mL/menit, setiap fraksi enzim yang ditampung dilakukan pengukuran kadar protein dan aktivitas enzimnya. Fraksi aktif dikumpulkan kemudian dianalisis berat molekulnya dengan cara SDS-PAGE.

3.4.8 Penentuan berat molekul protein protease menggunakan SDS-PAGE

Fraksi dielektroforesis dilakukan untuk menentukan homogenitas dan berat molekul dari protease yang dihasilkan dengan metode SDS-PAGE (Fujita et al.,

2019). Pita protein divisualisasikan dengan pewarnaan 0,2% coomasie brilliant blue R-250 dan dihilangkan dengan dicuci selama 24 jam dengan campuran asam asetat-alkohol-air (5:5:1 v/v). Berat molekul protase murni ditentukan oleh SDS-PAGE menggunakan protein standar (Thermo Scientific Page Ruler) untuk sebagai referensi.

3.5 Hasil dan pembahasan

3.5.1 Hasil produksi protease

Penentuan kondisi optimum produksi protease

Berdasarkan skrining, isolat *S. algae* dengan indeks proteolitik tertinggi diseleksi untuk produksi enzim. Kinetika produksi protease selama 96 jam inkubasi memperlihatkan korelasi dinamis antara pertumbuhan sel (OD) dan aktivitas proteolitik.

Fase Lag (0-12 jam) menunjukkan karakteristik unik dimana OD masih rendah (0.330-0.650), namun kadar protein berada pada level tertinggi (0.680-0.710 mg/mL), sementara aktivitas protease justru paling rendah (0.35-0.38 U/mL). Tingginya kadar protein total pada fase ini kontras dengan rendahnya aktivitas protease spesifik, mengindikasikan bahwa sebagian besar protein terukur merupakan protein struktural dan enzim metabolik primer yang diperlukan untuk pertumbuhan sel, bukan protease ekstraseluler (Adkar et al., 2017). Kondisi ini mencerminkan periode adaptasi fisiologis dimana metabolisme sel teralokasi untuk biosintesis komponen seluler esensial, bukan sekresi enzim ekstraseluler. Aktivitas protease rendah dan konstan pada jam awal sangat mungkin berasal dari enzim yang sudah diproduksi oleh sel inokulum pada fase akhir pertumbuhan sebelumnya dan terbawa ke dalam medium baru (Mohan & R, 2023). Enzim ekstraseluler bersifat stabil dalam medium, sehingga aktivitas katalitiknya tetap dapat terukur meskipun sel tidak memproduksinya untuk sementara waktu. Fase lag ini merupakan periode adaptasi fisiologis di mana sel mempersiapkan mesin selulernya sebelum beralih ke fase produksi enzim ekstraseluler, yang biasanya terjadi pada fase pertumbuhan stasioner ketika nutrisi sederhana telah terkonsumsi (Oliveira et al., 2020).

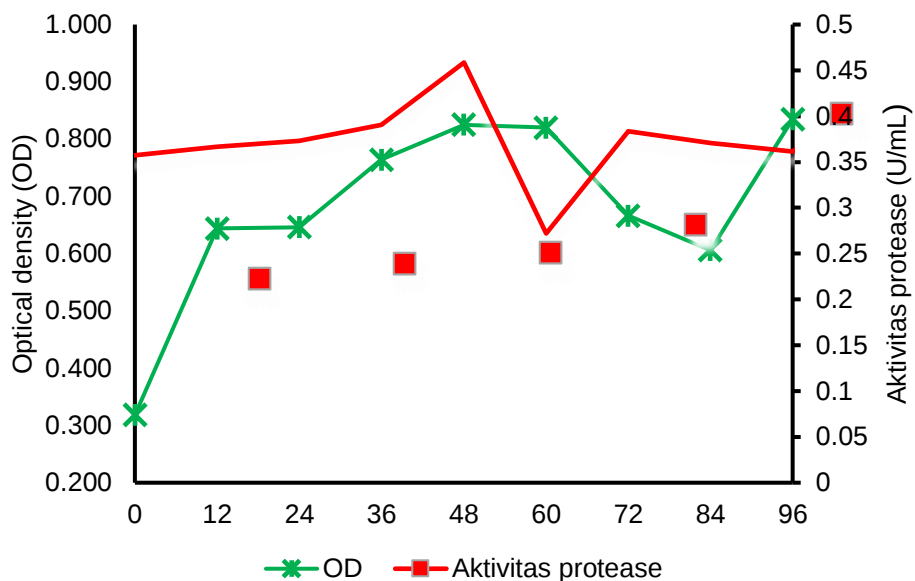
Peningkatan OD hingga 0.82 dan capaian aktivitas protease optimal 0.46 U/mL selama fase logaritmik (24–48 jam) memiliki korelasi positif. Namun secara paradoks, fase ini ditandai dengan penurunan kadar protein total dari 0.710 mg/mL menjadi 0.630 mg/mL meskipun biomassa sel meningkat drastis. Fenomena ini dapat dijelaskan oleh efek dilusi akibat peningkatan volume biomassa dan konsumsi protein ekstraseluler oleh sel sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhan cepat. Meskipun konsentrasi protein total menurun, aktivitas protease meningkat signifikan, mengindikasikan bahwa proporsi protease dalam total protein ekstraseluler meningkat dan aktivitas spesifik enzim menjadi lebih tinggi. Hal ini mengonfirmasi karakter produksi protease sebagai enzim yang bergantung pada pertumbuhan, dengan laju biosintesis tertinggi terjadi seiring dengan puncak aktivitas metabolik dan biomassa sel (Wilson et al., 2017). Korelasi negatif antara kadar protein total dengan peningkatan biomassa menunjukkan adanya turnover protein yang tinggi, dimana

protein ekstraseluler digunakan kembali oleh sel untuk mendukung pertumbuhan eksponensial.

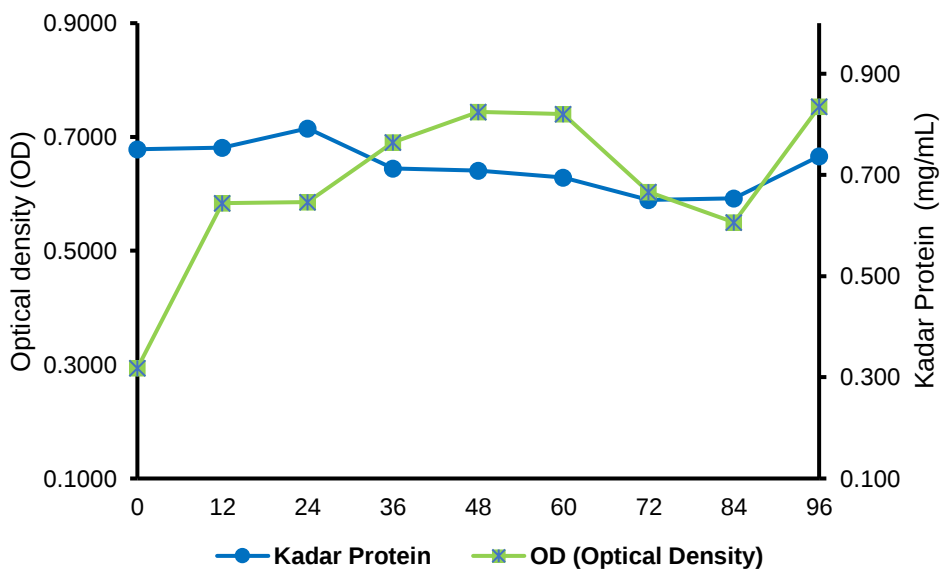
Fase stasioner (60–72 jam) ditandai stabilisasi OD (0.81–0.76), kadar protein yang relatif rendah dan stabil (0.600–0.620 mg/mL), namun terjadi penurunan aktivitas protease dari 0.46 U/mL menjadi 0.38 U/mL. Depleksi nutrisi dan akumulasi metabolit sekunder menghambat kapasitas biosintetik sel meskipun enzim tersekresikan tetap mempertahankan aktivitas katalitik (Cesar et al., 2022). Penurunan aktivitas protease yang lebih drastis dibandingkan penurunan kadar protein total menunjukkan terjadinya inaktivasi parsial enzim, kemungkinan akibat auto-proteolisis atau denaturasi struktural. Stabilitasnya kadar protein pada level rendah mengindikasikan keseimbangan antara produksi protein yang menurun, degradasi proteolitik, dan pelepasan protein dari sel yang mengalami stress.

Fase kematian (72–96 jam) menunjukkan fluktuasi OD (0.76→0.60→0.85), peningkatan kadar protein dari 0.600 mg/mL menjadi 0.650–0.680 mg/mL pada jam ke-84 dan 96, serta fluktuasi aktivitas protease (0.38→0.25→0.40 U/mL). Peningkatan kadar protein pada fase akhir ini sangat mungkin disebabkan oleh autolisis sel yang melepaskan protein intraseluler ke medium ekstraseluler, termasuk enzim-enzim sitoplasma dan protein struktural (Lewis, 2000; Boon et al., 2020). Fenomena bifasik pada aktivitas protease dengan penurunan tajam pada jam ke-60 (0.25 U/mL) diikuti peningkatan kembali pada jam ke-72–96 (0.40 U/mL) berkorelasi dengan peningkatan kadar protein, mengindikasikan bahwa sebagian protease intraseluler yang terlepas masih memiliki aktivitas katalitik atau terjadi induksi ulang sintesis enzim sebagai respons terhadap ketersediaan substrat protein dari sel yang lisis. Meskipun kadar protein meningkat kembali mendekati level awal, aktivitas protease tidak kembali ke puncaknya, menunjukkan bahwa protein yang terlepas dari lisis sel tidak semuanya berupa protease aktif dan terdapat degradasi proteolitik enzim serta destabilisasi struktural akibat perubahan pH lingkungan dan hilangnya kofaktor esensial.

Secara keseluruhan, produksi protease oleh *S. algae* mengikuti pola pertumbuhan bakteri, dengan aktivitas optimal dicapai pada akhir fase eksponensial (jam ke-48). Untuk optimalisasi produksi dan pemanenan enzim dalam aplikasi bioteknologi, waktu inkubasi paling efektif adalah pada rentang 48–60 jam, di mana aktivitas protease mencapai nilai maksimal sebelum memasuki fase penurunan yang signifikan. Hal ini menunjukkan produksi protease optimal terjadi saat pertumbuhan sel mencapai puncaknya, sebelum nutrisi habis dan metabolit toksik terakumulasi yang menghambat aktivitas enzim.



Gambar 3.1 Grafik kurva pertumbuhan dan aktivitas *protease S alage* pada kondisi fermentasi: suhu 37°C, pH 7, konsentrasi substrat 1%, kecepatan aerasi 180 rpm



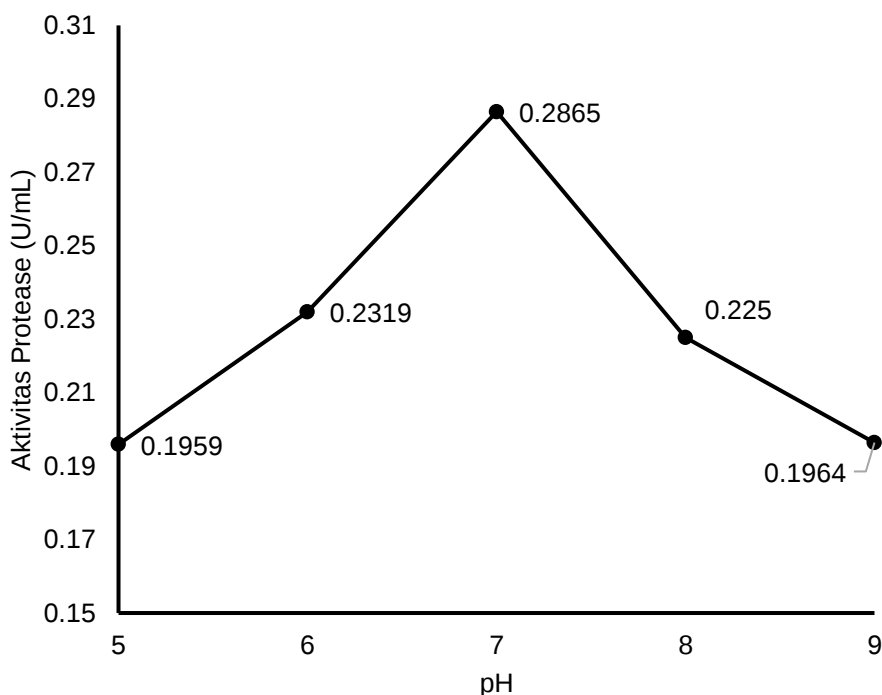
Gambar 3.2 Grafik kurva pertumbuhan dan kadar protein *S alage* pada kondisi fermentasi: suhu 37°C, pH 7, konsentrasi substrat 1%, kecepatan aerasi 180 rpm

3.5.2 Karakterisasi protease dari *Shewanella algae*

Pengaruh perubahan pH terhadap aktivitas protease. Determinasi pH optimum protease merupakan parameter kritis dalam karakterisasi enzim karena pH mempengaruhi konformasi struktural dan ionisasi residu katalitik pada situs aktif. Deviasi pH menginduksi alterasi muatan yang mengkompromikan efisiensi katalitik (Gado et al., 2025).

Protease *S. algae* menunjukkan aktivitas maksimum pada pH 7 (0,2865 U/mL) dengan penurunan signifikan pada pH 5 (0,1959 U/mL) dan pH 9 (0,1964 U/mL), mengklasifikasikan enzim sebagai neutral protease. Penurunan aktivitas pada pH ekstrem disebabkan denaturasi parsial dan destabilisasi kompleks enzim-substrat (Gado et al., 2025).

Karakteristik pH netral memberikan aplikabilitas luas dalam bioteknologi: hidrolisis protein industri pangan, produksi peptida bioaktif farmasi, dan biodegradasi limbah organik (Naveed et al., 2021). Profil ini konsisten dengan protease mikroorganisme seperti *Bacillus* sp. dan *Streptomyces* sp. yang menunjukkan pH optimum netral-alkali (Hardi et al., 2017; Pamungkas et al., 2022), dimana inaktivasi di luar pH optimum diatributkan pada perubahan distribusi ion H^+ yang mengganggu geometri situs aktif (Yusriadi et al., 2019)

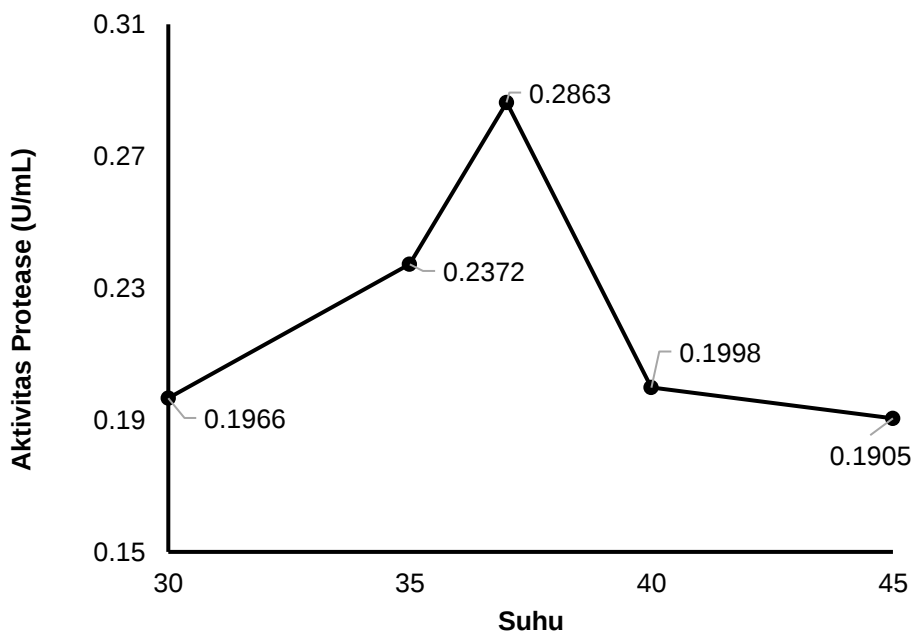


Gambar 3.3 Pengaruh pH terhadap aktivitas protease *S.algae*, pada kondisi 37⁰ C , konsentrasi substrat 1%

Pengaruh perubahan suhu terhadap aktivitas protease. Suhu merupakan parameter kritis dalam katalisis enzimatis yang mempengaruhi energi kinetik molekular dan stabilitas struktural protein. Protease *S. algae* menunjukkan aktivitas maksimum pada 37 °C (0,2863 U/mL) dengan peningkatan progresif dari 30 °C, kemudian mengalami penurunan signifikan pada 40 °C (0,1998 U/mL) dan 45 °C (0,1905 U/mL).

Peningkatan aktivitas hingga suhu optimum disebabkan oleh akselerasi energi kinetik yang meningkatkan frekuensi kolisi efektif enzim-substrat dan pembentukan kompleks katalitik (Ooka et al., 2023). Penurunan aktivitas pada suhu supraoptimal diatributkan pada denaturasi termal dimana ikatan nonkovalen (hidrogen, ionik, hidrofobik) yang mempertahankan konformasi tersier mengalami disrupsi, mengakibatkan distorsi geometri situs aktif dan hilangnya fungsi katalitik meskipun energi kinetik tinggi (Kabir & Ju, 2023; Robinson, 2015).

Profil suhu optimum 37°C mengklasifikasikan protease *S. algae* sebagai enzim mesofilik, konsisten dengan protease mikroorganisme mesofilik lainnya (30–40 °C) (Hardi et al., 2017; Utami, 2023). Karakteristik ini memberikan keunggulan aplikatif pada bioprocessing kondisi fisiologis (industri pangan, farmasi, medis) dengan efisiensi energi optimal (Liu et al., 2023).

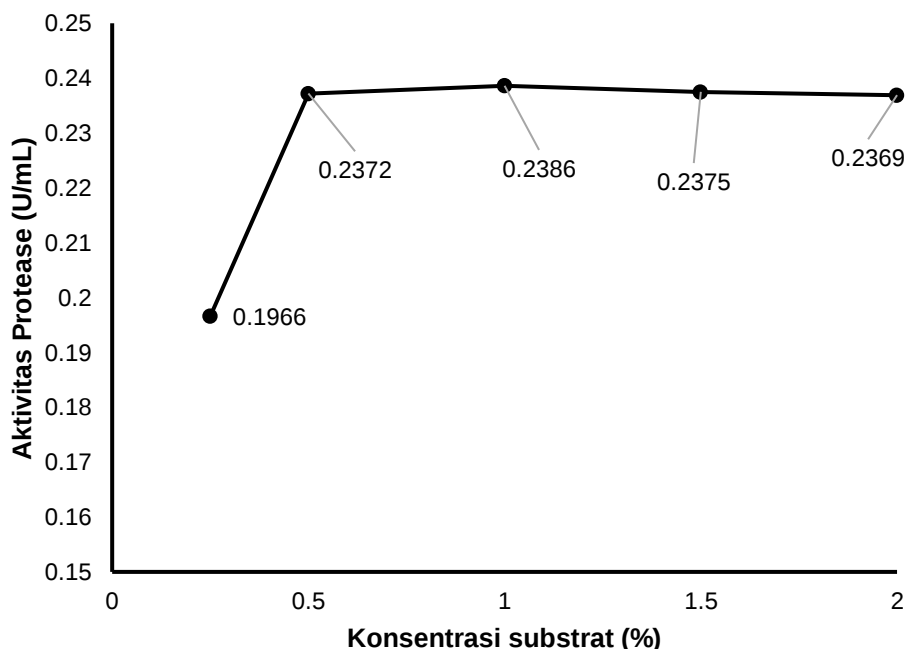


Gambar 3.4 Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease *S. algae*, pada kondisi pH 7, konsentrasi substrat 1%,

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas protease. Konsentrasi substrat memegang peran krusial dalam efisiensi katalisis enzim. Pada protease dari *S. algae*, aktivitas enzim menunjukkan peningkatan seiring konsentrasi substrat hingga mencapai titik optimal pada 1,0% dengan aktivitas spesifik 0,2386 U/mL, diikuti oleh fase jenuh hingga konsentrasi 2,0%.

Fenomena saturasi pada konsentrasi optimum 1,0% merepresentasikan kinetika jenuh khas enzim. Pada kondisi suboptimal, substrat menjadi faktor pembatas sehingga laju reaksi proporsional dengan konsentrasinya. Ketika konsentrasi substrat meningkat, semakin banyak kompleks enzim-substrat yang terbentuk hingga semua molekul enzim bekerja pada kapasitas maksimumnya. Pada keadaan jenuh, enzim beroperasi pada V_{max} , dan laju reaksi hanya bergantung pada batas kapasitas katalitik enzim (Voet et al., 2016).

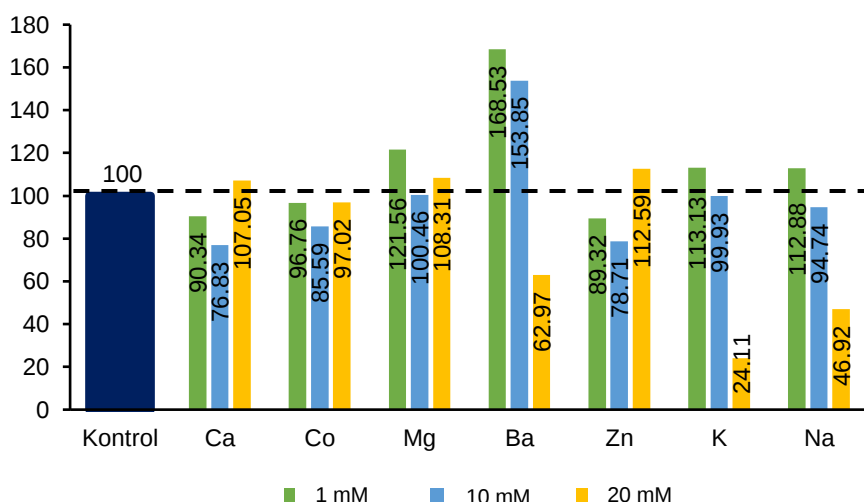
Penentuan konsentrasi optimum substrat sebesar 1,0% memiliki implikasi aplikasi yang signifikan. Penambahan substrat melebihi titik optimum ini tidak lagi meningkatkan produktivitas reaksi, melainkan hanya menambah biaya produksi akibat pemborosan substrat (Sahin et al., 2023). Sebaliknya, penggunaan substrat pada konsentrasi suboptimal tidak memanfaatkan kapasitas katalitik maksimum enzim, sementara konsentrasi yang berlebihan berisiko menyebabkan inhibisi oleh substrat dan inefisiensi material (Smirnovienė et al., 2021). Oleh karena itu, pemahaman terhadap parameter kinetika ini sangat esensial untuk optimasi proses bioproses guna mencapai efisiensi katalitik tertinggi dengan biaya operasional yang minimal.



Gambar 3.5 Penentuan konsentrasi substrat optimum terhadap aktivitas protease *S. algae* pada kondisi 37^o C, pH 7

Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim protease.

Pengujian pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim protease dilakukan untuk mengevaluasi peran ion logam sebagai kofaktor, aktivator, atau inhibitor dalam proses katalitik, serta untuk mengidentifikasi kondisi ionik yang paling mendukung aktivitas enzim. Banyak enzim protease, khususnya yang disekresikan oleh bakteri, diketahui memiliki ketergantungan parsial atau spesifik terhadap ion logam yang berfungsi menstabilkan struktur tersier, menjaga integritas sisi aktif, atau memfasilitasi interaksi enzim–substrat. Sebaliknya, ion logam pada konsentrasi tertentu juga dapat menghambat aktivitas enzim melalui gangguan keseimbangan muatan, kompetisi dengan residu katalitik, atau perubahan kekuatan ionik medium reaksi.



Gambar 3.6 Pengaruh penambahan ion logam terhadap aktivitas protease *S. alga*, pada kondisi suhu 37°C, pH 7, konsentrasi substrat 1%,

Data pada grafik menunjukkan pengaruh spesifik jenis ion logam dan konsentrasinya terhadap aktivitas enzim protease, yang diekspresikan sebagai aktivitas relatif dengan kontrol = 100%. Pada kondisi pengujian terkontrol (suhu 37°C, pH 7, konsentrasi substrat 1%), nilai di atas 100% diinterpretasikan sebagai aktivator, sedangkan di bawah 100% sebagai inhibitor.

Secara umum, respons enzim memperlihatkan pola konsentrasi-dependen dan ion-spesifik, suatu karakter khas enzim protease yang sensitif terhadap kekuatan ionik dan keberadaan kofaktor logam.

Konsentrasi 1 mM, hampir seluruh ion terutama Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Na^+ , dan Co^{2+} meningkatkan aktivitas di atas kontrol. Ba^{2+} menunjukkan aktivasi paling kuat, menandakan peran dominan dalam stabilisasi konformasi sisi aktif atau peningkatan

afinitas enzim terhadap substrat. Mg^{2+} juga bertindak sebagai aktivator kuat, konsisten dengan perannya sebagai kofaktor struktural yang menstabilkan interaksi enzim–substrat. Sebaliknya, Ca^{2+} berada di bawah 100%, sehingga bersifat inhibitor ringan pada konsentrasi rendah ini.

Konsentrasi 10 mM, terjadi penurunan aktivitas pada hampir semua ion, dengan sebagian besar nilai berada di sekitar atau di bawah 100%. Fenomena ini menunjukkan inhibisi akibat kelebihan ion, kemungkinan melalui gangguan keseimbangan muatan, kompetisi dengan residu katalitik, atau perubahan mikrolingkungan (ionic strength) yang merusak struktur tersier enzim. Meskipun demikian, Ba^{2+} masih mempertahankan aktivitas di atas kontrol, mengindikasikan toleransi enzim yang lebih tinggi terhadap ion ini dibandingkan ion lain.

Konsentrasi 20 mM, aktivitas enzim meningkat kembali pada sebagian besar ion, terutama Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , dan Co^{2+} , sehingga kembali berperan sebagai aktivator. Pola ini mencerminkan respons bifasik (aktivasi–inhibisi–reaktivasi parsial), yang sering dijumpai pada enzim protease. Reaktivasi pada konsentrasi menengah tinggi dapat terjadi ketika efek stabilisasi konformasi kembali mendominasi dibandingkan efek inhibisi ionik.

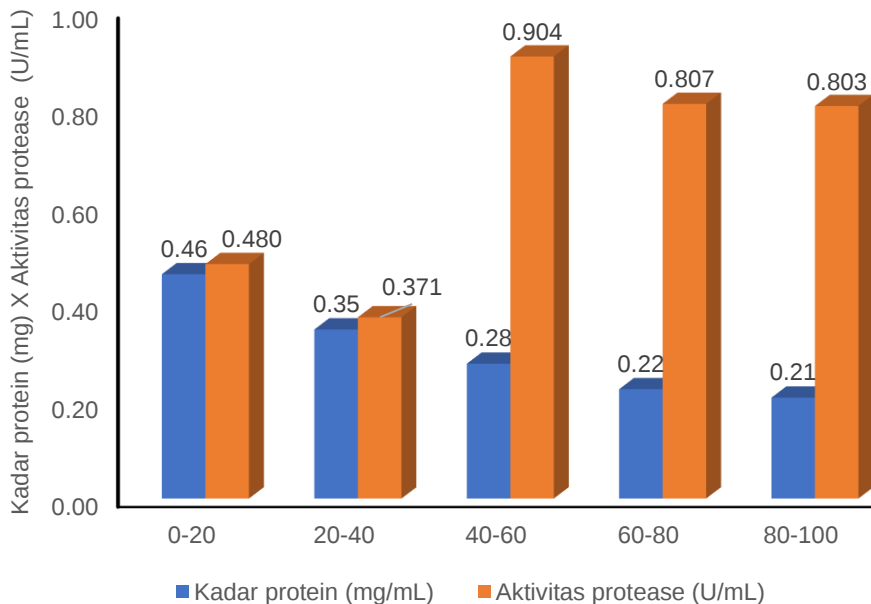
Secara keseluruhan, data ini menegaskan bahwa Ba^{2+} merupakan aktivator paling konsisten dan kuat pada seluruh rentang konsentrasi, sementara Mg^{2+} dan K^+ bertindak sebagai aktivator moderat yang efektif pada konsentrasi tertentu. Ca^{2+} dan Zn^{2+} cenderung bersifat inhibitor atau hanya memberikan aktivasi terbatas, tergantung konsentrasi. Temuan ini menunjukkan bahwa aktivitas protease tidak hanya ditentukan oleh keberadaan ion logam, tetapi oleh kombinasi jenis ion dan konsentrasinya, yang memengaruhi stabilitas struktur dan efisiensi katalitik enzim.

3.5.3 Pemurnian protease *Shewanella algae*

Pengendapan dengan amonium sulfat, dialisis dan kromatografi kolom Sephadex G-75

Fraksinasi amonium sulfat menunjukkan distribusi protein dan aktivitas protease yang bervariasi. Fraksi F1 memiliki kadar protein tertinggi (0,46 mg/mL) dengan aktivitas protease 0,480 U/mL. F2 menunjukkan kadar protein 0,35 mg/mL dengan aktivitas terendah (0,371 U/mL), mengindikasikan separasi komponen protein dengan aktivitas katalitik rendah.

Fraksi F3 menunjukkan profil optimal dengan kadar protein 0,28 mg/mL dan aktivitas protease maksimum 0,904 U/mL, mencerminkan tingkat kemurnian tertinggi. F4 dan F5 memperlihatkan kadar protein lebih rendah (0,22 dan 0,21 mg/mL) dengan aktivitas protease 0,807 dan 0,803 U/mL, berturut-turut.



Gambar 3.7 Pengaruh tingkat kejenuhan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%) terhadap aktivitas protease *S. algae*

F3 (40-60%) diseleksi sebagai fraksi optimal karena menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi dengan kadar protein yang adekuat untuk aplikasi lanjutan. Profil ini mengindikasikan karakteristik kelarutan protease optimal pada tingkat saturasi amonium sulfat tertentu. Pemurnian selanjutnya difokuskan pada F3 melalui dialisis dan kromatografi kolom untuk meningkatkan kemurnian dan aktivitas katalitik. Langkah selanjutnya adalah melakukan proses dialisis pada fraksi F3 untuk menghilangkan sisa-sisa amonium sulfat dan komponen kecil lainnya, dengan tujuan untuk mendapatkan protease dalam bentuk yang lebih murni. Dialisis akan membantu memastikan bahwa aktivitas enzim yang terukur benar-benar berasal dari protease dan bukan karena efek garam atau komponen lain yang ada dalam larutan. Hasil dialisis dapat dilihat pada Tabel 3. 2 hasil pemurnian dialisis protease dari bakteri *S. algae*.

Proses pemurnian protease dari *S. algae* berhasil meningkatkan kemurnian enzim secara signifikan, sebagaimana tercermin pada peningkatan aktivitas spesifik dan nilai kemurnian. Dari ekstrak kasar (aktivitas spesifik 6.98 U/mg), proses fraksinasi dengan amonium sulfat 40-60% berhasil meningkatkan kemurnian menjadi 2.20x dengan aktivitas spesifik 15.37 U/mg. Proses dialisis selanjutnya meningkatkan kemurnian hingga 5.72x dengan aktivitas spesifik 39.93 U/mg. Puncak pemurnian dicapai melalui kromatografi gel filtrasi Sephadex G-75, di mana fraksi 12 menunjukkan performa terbaik dengan aktivitas spesifik 207 U/mg dan kemurnian

29.64x, mengindikasikan keberhasilan isolasi enzim target dari protein pengotor lainnya.

Tabel 3.2 Pola kemurnian protease dari *S. algae* pada ekstrak kasar, fraksi amonium sulfat dan hasil dialisis, dan Sephadex G-75

Tahap pemurnian	Vol (mL)	Protein (mg/L)	Total Protein (mg)	Aktivitas Protease (U/mL)	Total Protease (Unit)	Aktivitas Protease Spesifik (U/mg)	Kemurnian
Ekstrak kasar	1000	0.063	63	0,440	440	6.984	1
Am. sulfat (40-60%)	15	0.276	4.14	4.421	63.62	15.365	2.20
Dialisis	17	0.048	0.816	1.916	32.58	39.93	5.72
Sephadex G-75							
Fraksi 8	3	0.01	0.03	1.631	4.893	163.1	23.35
Fraksi 12	3	0.01	0.03	2.069	6.207	207	29.64
Fraksi 14	3	0.01	0.03	1.015	3.045	101.5	14.53

Berat molekul protein protease Shewanella algae menggunakan SDS-PAGE

Analisis Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) dilakukan untuk mengetahui profil protein pada hasil pemurnian protease fraksi ke-12. SDS-PAGE merupakan metode yang umum digunakan untuk menentukan berat molekul relatif protein dan menilai tingkat kemurnian hasil pemurnian. Teknik ini memisahkan protein berdasarkan perbedaan berat molekulnya dalam kondisi denaturasi yang diinduksi oleh SDS, sehingga migrasi protein dalam gel hanya dipengaruhi oleh ukuran molekulnya (Kielkopf et al., 2021).

Penelitian ini menggunakan protein marker standar dengan rentang berat molekul 11 hingga 245 kDa. Berdasarkan hasil analisis pita protein menggunakan pewarnaan Coomassie Brilliant Blue (CBB), pita dominan menunjukkan berat molekul sekitar 75 kDa (Gambar 4.7). Posisi ini bertepatan dengan pita berwarna merah pada marker standar 75 kDa, sehingga dapat dipastikan bahwa protein utama dalam fraksi ini memiliki berat molekul sekitar 75 kDa. Hasil pewarnaan silver stain menunjukkan beberapa pita tambahan dengan berat molekul lebih rendah, yaitu sekitar 53 kDa, 45 kDa, 35 kDa, dan 20 kDa. Pita-pita ini kemungkinan merupakan hasil degradasi protein, subunit nonaktif, atau kontaminan minor dari proses pemurnian. Namun, pita dominan tetap konsisten pada posisi 75 kDa, sehingga

dapat disimpulkan bahwa protein target utama terdapat pada kisaran berat molekul tersebut. Fraksi ke-12 merupakan fraksi dengan tingkat kemurnian tertinggi.

Fraksi awal (W2–W6) masih memperlihatkan lebih dari satu pita yang menunjukkan keberadaan beberapa jenis protein dengan ukuran berbeda. Setelah proses pemurnian, fraksi ke-12 menghasilkan satu pita dominan tunggal yang menunjukkan pemisahan protein target telah mencapai tingkat kemurnian optimal.

Berdasarkan berat molekul sekitar 75 kDa, protein ini diduga merupakan protease target penelitian. Protease mikroba umumnya memiliki berat molekul antara 60 hingga 80 kDa (Song et al., 2023). Protease dari genus *Shewanella* memiliki berat molekul yang bervariasi, seperti protease serin dari *Shewanella arctica* (67 kDa) dan protease serin alkali dari *Shewanella algae* (45 kDa) (Javee et al., 2022). Hasil ini menunjukkan protease dari *S. algae* berada dalam rentang berat molekul yang umum ditemukan pada protease mikroba. Disimpulkan bahwa pita dominan pada posisi 75 kDa merupakan protein utama yang sangat mungkin adalah protease hasil pemurnian fraksi ke-12. Pita tunggal yang jelas menunjukkan bahwa fraksi ini telah mencapai tingkat kemurnian tinggi dan siap untuk pengujian lanjutan.

3.6 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Produksi protease *Shewanella algae* mencapai optimum pada jam ke-48 kultivasi dengan aktivitas spesifik 0,458 U/mL yang bertepatan dengan fase pertumbuhan eksponensial (OD 0,82).
2. Protease tergolong neutral protease mesofilik dengan kondisi optimum pH 7 (0,2865 U/mL) dan suhu 37°C (0,2863 U/mL), serta kejenuhan substrat pada konsentrasi kasein 1 % (0,2386 U/mL).
3. Protease merupakan metaloenzim yang diaktivasi oleh Ba²⁺, yang merupakan aktivator, diikuti oleh Mg²⁺ dan K⁺ sebagai aktivator moderat, sedangkan Ca²⁺ dan Zn²⁺ cenderung bersifat inhibitor. Sebagian besar ion mengaktivasi enzim pada konsentrasi rendah (1 mM), menghambat aktivitas pada konsentrasi menengah (10 mM) akibat gangguan kekuatan ionik, dan menunjukkan reaktivasi parsial pada konsentrasi tinggi (20 mM).
4. Pemurnian protease melalui fraksinasi amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi gel filtrasi Sephadex G-75 menghasilkan peningkatan kemurnian 29,64 kali lipat dengan aktivitas spesifik 207 U/mg pada fraksi F12 dan yield 14,05%.
5. Analisis SDS-PAGE menunjukkan berat molekul protease murni sebesar 75 kDa dengan koefisien determinasi R² = 0,9846, mengkonfirmasi homogenitas enzim hasil pemurnian.
6. Protease *Shewanella algae* memiliki potensi aplikasi dalam industri bioteknologi, farmasi, dan pangan yang memerlukan enzim proteolitik dengan aktivitas optimal pada kondisi netral dan suhu moderat.

3.7 Daftar pustaka

- Adkar, B. V., Manhart, M., Bhattacharyya, S., Tian, J., Musharbash, M., & Shakhnovich, E. I. 2017. Optimization of lag phase shapes the evolution of a bacterial enzyme. *Nature Ecology & Evolution*, 1(6), 149. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0149>.
- Akhtar, M., & Wright, J. N. 2022. A review of ¹⁸O labelling studies to probe the mechanism of aromatase (CYP19A). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 216, 106010. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.106010>.
- Albayati, S. H., Nezhad, N. G., Taki, A. G., & Rahman, R. N. Z. R. A. 2024. Efficient and feasible biocatalysts: Strategies for enzyme improvement. A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 276, 133978. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133978>.
- Almeida, V. M., & Marana, S. R. 2019. Optimum temperature may be a misleading parameter in enzyme characterization and application. *PloS One*, 14(2), e0212977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212977>.
- Andrew, S. M., Titus, J. A., & Zumstein, L. 2002. Dialysis and concentration of protein solutions. *Current Protocols in Toxicology*, Appendix 3, A.3H.1-5. <https://doi.org/10.1002/0471140856.txa03hs10>.
- Arcus, V. L., & Mulholland, A. J. 2020. Temperature, dynamics, and enzyme-catalyzed reaction rates. *Annual Review of Biophysics*, 49, 163–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-121219-081520>.
- Arcus, V. L., van der Kamp, M. W., Pudney, C. R., & Mulholland, A. J. 2020. Enzyme evolution and the temperature dependence of enzyme catalysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 65, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.001>.
- Baksi, S., Sarkar, U., Villa, R., Basu, D., & Sengupta, D. 2023. Conversion of biomass to biofuels through sugar platform: A review of enzymatic hydrolysis, highlighting the trade-off between product and substrate inhibitions. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 55, 102963. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102963>.
- Billman, G. E. 2020. Homeostasis: The underappreciated and far too often ignored central organizing principle of physiology. *Frontiers in Physiology*, 11, 200. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00200>.
- Boon, L., Ugarte-Berzal, E., Vandooren, J., & Opdenakker, G. 2020. Protease propeptide structures, mechanisms of activation, and functions. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 55(2), 111–165. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1742090>.
- Borkakoti, N., Ribeiro, A. J. M., & Thornton, J. M. 2025. A structural perspective on enzymes and their catalytic mechanisms. *Current Opinion in Structural Biology*, 92, 103040. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2025.103040>.

- Cesar, S., Willis, L., & Huang, K. C. 2022. Bacterial respiration during stationary phase induces intracellular damage that leads to delayed regrowth. *IScience*, 25(3), 103765. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103765cross-attention>.
- Chaturvedi, S., Singh, A. K., Keshari, A. K., Maity, S., Sarkar, S., & Saha, S. 2016. Human metabolic enzymes deficiency: A genetic mutation-based approach. *Scientifica*, 2016, 9828672. <https://doi.org/10.1155/2016/9828672>.
- Cui, H., Su, Y., Dean, T. J., Yu, T., Zhang, Z., Peng, J., Shukla, D., & Zhao, H. 2025. Enzyme specificity prediction using cross attention graph neural networks. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09697-2.cross-attention>.
- Elshad, N., Huseyn, A., Farah, M., & Nigar, M. 2024. Enzymes are catalysts of biological reactions. 10(5), 9–12.
- Farhan, M., Hasani, I. W., Khafaga, D. S. R., Ragab, W. M., Nazir, R., Kazi, A., Aatif, M., Muteeb, G., & Fahim, Y. A. 2025. Enzymes as catalysts in industrial biocatalysis: Advances in engineering, applications, and sustainable integration. 1–31.
- Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. 2021. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.
- Fujita, T., Shiota, K., Yoshikawa, J., Ogawa, S., & Aoyagi, H. 2019. Simple method for analyzing the purity of protease-containing samples by acid-treatment SDS-PAGE. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(5), 630–635. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.014>.
- Gado, J. E., Knotts, M., Shaw, A. Y., Marks, D., Gauthier, N. P., Sander, C., & Beckham, G. T. 2025. Machine learning prediction of enzyme optimum pH. *Nature Machine Intelligence*, 7(5), 716–729. <https://doi.org/10.1038/s42256-025-01026-6>.
- Ghosh, A. C., Duboc, C., & Gennari, M. 2021. Synergy between metals for small molecule activation: Enzymes and bio-inspired complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 428, 213606. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213606>.
- Göbel, G., Müller, F., Talke, A., Ahnert, U., & Lisdat, F. 2024. Qualitative and quantitative protease activity tests based on protein degradation in three-dimensional structures. *Bioelectrochemistry*, 160, 108775. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108775>.
- Guengerich, F. P., & Yoshimoto, F. K. 2018. Formation and cleavage of C-C bonds by enzymatic oxidation-reduction reactions. *Chemical Reviews*, 118(14), 6573–6655. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00031>.
- Hazra, P., & Saha Kesh, G. 2017. Isolation and purification of phycocyanin from cyanobacteria of a mangrove forest. *Applied Biological Chemistry*, 60(6), 631–636. <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0320-x>.
- Helmann, J. D. 2025. Microbial metal physiology: Ions to ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 23(12), 805–819. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01213-7>.

- Hirsch, C., & Schildknecht, S. 2019. In vitro research reproducibility: Keeping up high standards. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1484. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01484>.
- Javee, A., Malairaj, S., & Subramani, N. 2022. Biosynthesis, protease optimization, and purification of alkaline serine from *Shewanella algae* and its potential application as silver recovery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 25, 100595. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100595>.
- Kabir, M. F., & Ju, L.-K. 2023. On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry*, 130, 734–746. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031>.
- Kalidas, C., & Sangaranarayanan, M. V. 2023. Co-enzymes and vitamins. In *Biophysical Chemistry: Techniques and Applications* (pp. 217–244). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-37682-5_10.
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. 2021. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(12). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102228>.
- Lewis, K. 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 503–514. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.503-514.2000>.
- Liu, Y., Jia, K., Chen, H., Wang, Z., Zhao, W., & Zhu, L. 2023. Cold-adapted enzymes: Mechanisms, engineering, and biotechnological application. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(10), 1399–1410. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02904-2>.
- M. H, H. 2021. Quantitative methods for alkaline protease determination and its applications: A comprehensive review. *International Journal of Clinical Case Reports and Reviews*, 6(1), 01–04. <https://doi.org/10.31579/2690-4861/072>.
- Mai, V. Q., Nhan, T. A., & Hammouch, Z. 2021. A mathematical model of enzymatic non-competitive inhibition by product and its applications. *Physica Scripta*, 96(12), 124062. <https://doi.org/10.1088/1402-4896/ac35c6>.
- Mbira, C., & Mbira, C. n.d. Influence of substrate concentration on enzyme activity in bio-catalysis in Uganda
- Morris, R., Black, K. A., & Stollar, E. J. 2022. Uncovering protein function: From classification to complexes. *Essays in Biochemistry*, 66(3), 255–285. <https://doi.org/10.1042/EBC20200108>.
- Mulholland, A. J. 2005. Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis. *Drug Discovery Today*, 10(20), 1393–1402. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03611-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03611-1).
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. 2021. Protease—A versatile and eco-friendly biocatalyst with multi-industrial applications: An updated review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307–323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.

- Olivieri, C., Wang, Y., Walker, C., Subrahmanian, M. V., Ha, K. N., Bernlohr, D. A., Gao, J., Camilloni, C., Vendruscolo, M., Taylor, S. S., & Veglia, G. 2023. The α C- β 4 loop controls the allosteric cooperativity between nucleotide and substrate in the catalytic subunit of protein kinase A. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.09.12.557419>.
- Ooka, H., Chiba, Y., & Nakamura, R. 2023. A thermodynamic principle to enhance enzymatic activity using the substrate affinity. *Nature Communications*, 14(1), 4860. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40471-y>.
- Pandey, G. 2024. Biochemical reactions: The chemical basis of life. 15(6), 1–2. <https://doi.org/10.14303/2141-9477.2024.120>.
- Pesaresi, A. 2023. Mixed and non-competitive enzyme inhibition: Underlying mechanisms and mechanistic irrelevance of the formal two-site model. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 2245168. <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2245168>.
- Peters, K., Staehlke, S., Rebl, H., Jonitz-Heincke, A., & Hahn, O. 2024. Impact of metal ions on cellular functions: A focus on mesenchymal stem/stromal cell differentiation.
- Pisco, J. P., de Chiara, C., Pacholarz, K. J., Garza-Garcia, A., Ogradowicz, R. W., Walker, P. A., Barran, P. E., Smerdon, S. J., & de Carvalho, L. P. S. 2017. Uncoupling conformational states from activity in an allosteric enzyme. *Nature Communications*, 8(1), 203. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00224-0>.
- Pu, H., Shi, C., & Sun, D.-W. 2025. Advanced supramolecular food safety sensing technology: Principles and applications. *Food Chemistry*, 493, 145698. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145698>.
- Punekar, N. S. 2025. Regulation of enzyme activity. In *Enzymes: Catalysis, kinetics and mechanisms* (pp. 527–561). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8179-9_38.
- Ribeiro, A. J. M., Riziotis, I. G., Tyzack, J. D., Borkakoti, N., & Thornton, J. M. 2023. EzMechanism: An automated tool to propose catalytic mechanisms of enzyme reactions. 20(10). <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02006-7>.
- Robinson, P. K. 2015. *Enzymes: Principles and biotechnological applications*. Essays in Biochemistry, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
- Rueda, N., Dos Santos, J. C. S., Ortiz, C., Torres, R., Barbosa, O., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. 2016. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. *Chemical Record* (New York, N.Y.), 16(3), 1436–1455. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600007>.
- Saeidnia, S., Manayi, A., & Abdollahi, M. 2015. From in vitro experiments to in vivo and clinical studies: Pros and cons. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(4), 218–224. <https://doi.org/10.2174/1570163813666160114093140>.

- Sahin, A., Weilandt, D. R., & Hatzimanikatis, V. 2023. Optimal enzyme utilization suggests that concentrations and thermodynamics determine binding mechanisms and enzyme saturations. *Nature Communications*, 14(1), 2618. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38159-4>.
- Schauenburg, D., & Weil, T. 2024. Chemical reactions in living systems. *Advanced Science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 11(8), e2303396. <https://doi.org/10.1002/adv.202303396>.
- Seetharaman, R., Advani, M. G., Tilak, L., & General, M. 2020. Enzymes as targets of drug action: An overview. May.
- Shaikh, I. A., Turakani, B., Malpani, J., Goudar, S. V., Mahnashi, M. H., Hamed Al-Serwi, R., Ghoneim, M. M., El-Sherbiny, M., Abdulaziz Mannasaheb, B., Alsaikhan, F., Sindagimath, V., Khan, A. A., Muddapur, U. M., Azzouz, S., Mohammed, T., & Shakeel Iqbal, S. M. 2023. Extracellular protease production, optimization, and partial purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and its applications. *Journal of King Saud University - Science*, 35(1), 102429. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429>.
- Sheldon, R. A., Brady, D., & Bode, M. L. 2020. The Hitchhiker's guide to biocatalysis: Recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chemical Science*, 11(10), 2587–2605. <https://doi.org/10.1039/c9sc05746c>.
- Shrestha, S., & Chio, C. 2022. Optimization of multiple enzyme production by fermentation using lipid-producing *Bacillus* sp. (11) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1049692>.
- Sin, J. W., Chau, S. L., Burwood, R. P., Püntener, K., Bigler, R., & Schwaller, P. 2025. Highly parallel optimisation of chemical reactions through automation and machine intelligence. *Nature Communications*, 16(1), 6464. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-61803-0>.
- Smirnovienė, J., Baranauskienė, L., Zubrienė, A., & Matulis, D. 2021. A standard operating procedure for an enzymatic activity inhibition assay. *European Biophysics Journal*, 50(3), 345–352. <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01530-8>.
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. 2023. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1236368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>.
- Tennalli, G. B., Garawadmath, S., Sequeira, L., Murudi, S., Patil, V., Divate, M. N., & Hungund, B. S. 2022. Media optimization for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* PW3A using response surface methodology. 10(4), 17–26. <https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100403>.
- Vaisar, D., & Ahn, N. G. 2024. Latent allosteric control of protein interactions by ATP-competitive kinase inhibitors. *Current Opinion in Structural Biology*, 89, 102935. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2024.102935>.

- Waterborg, J. H. 2002. The Lowry method for protein quantitation. In J. M. Walker (Ed.), *The protein protocols handbook* (pp. 7–9). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:7>.
- Waterborg, J. H. 2009. The Lowry method for protein quantitation. In J. M. Walker (Ed.), *The protein protocols handbook* (pp. 7–10). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_2.
- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T. D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C. D., & Holmes, A. E. 2017. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini-review. *Research & Reviews. Journal of Engineering and Technology*, 6(4).
- Wingfield, P. 2001. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, Appendix 3, Appendix 3F. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>.
- Wojcik, M., & Miłek, J. 2016. A new method to determine optimum temperature and activation energies for enzymatic reactions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(8), 1319–1323. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1596-7>.
- Wysiadecki, G., Orkisz, S., Balawender, K., Golberg, M., & Żytkowski, A. 2024. The human body - not only a biological entity. *Translational Research in Anatomy*, 34, 100270. <https://doi.org/10.1016/j.tria.2023.100270> industrial applications: An updated review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307–323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.

BAB IV

STUDI *IN SILICO* INTERAKSI MOLEKUL MRSA, IDENTIFIKASI SENYAWA HASIL PEMURNIAN PROTEASE *Shewanella algae* METODE LC-MS/MS

4.1 Abstrak

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan patogen berbahaya yang resisten terhadap berbagai antibiotik β -laktam, menyebabkan infeksi nosokomial yang sulit diobati. Penyebaran MRSA yang meluas menuntut pengembangan agen antimikroba baru melalui pemanfaatan senyawa bioaktif dan pengembangan inhibitor molekuler yang menargetkan protein esensial bakteri. **Tujuan:** mengidentifikasi senyawa bioaktif dari hasil pemurnian protease fraksi 12 *S. algae* menggunakan LC-MS/MS dan menganalisis interaksi molekuler terhadap protein target MRSA (1MWR, 1MWT, 2IWC, 2IWD) melalui molekuler docking untuk mengevaluasi potensinya sebagai kandidat inhibitor antibakteri. **Metode:** identifikasi senyawa menggunakan LC-MS/MS. Protein target diunduh dari Protein Data Bank dan dipreparasi menggunakan Biovia Discovery Studio 2021. Ligan (Arginin, Lysine, Glutamic Acid, β -lactoglobulin, Netropsin) diperoleh dari PubChem. Simulasi docking dilakukan menggunakan PyRx dengan AutoDock Vina pada situs aktif protein target. **Hasil:** LC-MS/MS berhasil mengidentifikasi Netropsin dengan massa molekul 430,2181 Da, waktu retensi 5,549 menit, dan skor kecocokan tinggi (96,35). Protein 2IWD menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi terhadap semua ligan, dengan residu kunci LYS437, THR529, dan LYS528. Netropsin membentuk interaksi kompleks pada seluruh protein target: empat ikatan hidrogen pada 1MWR (ASN540, ASN543, ASN545, ASN561), enam ikatan hidrogen pada 1MWT (GLN521, THR444, TYR519, SER400), dua ikatan hidrogen kuat pada 2IWC (LYS437, MET436), dan lebih dari sepuluh interaksi pada 2IWD meliputi ikatan hidrogen konvensional, karbon hidrogen, dan hidrofobik. Ikatan multipoin menunjukkan stabilitas kompleks tinggi dengan nilai energi pengikatan negatif. **Kesimpulan:** protein 2IWD berpotensi sebagai target molekuler paling efektif untuk pengembangan inhibitor MRSA. Netropsin merupakan kandidat kuat agen penghambat molekuler MRSA dengan kemampuan pengikatan spesifik tinggi

Kata kunci: Antibakteri, interaksi molekuler, LC-MS/MS, molekuler docking, MRSA, netropsin, protein target

4.2 Pendahuluan

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan salah satu tantangan besar dalam bidang kesehatan global karena telah mengembangkan resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik, khususnya methicillin dan antibiotik β -laktam lainnya, termasuk sefalosporin dan penisilin yang biasa digunakan untuk mengatasi

infeksi bakteri Gram positif (Abebe & Birhanu, 2023; Alghammal et al., 2020; Ali Alghamdi et al., 2023; Mancuso et al., 2021). Resistensi ini menyebabkan infeksi yang lebih sulit diobati karena pengobatan yang efektif semakin terbatas. MRSA telah menjadi penyebab utama infeksi nosokomial yang didapatkan pasien selama dirawat di rumah sakit, terutama di unit perawatan intensif (Collaborators, 2022; Nazir et al., 2025). Infeksi MRSA dapat memengaruhi berbagai bagian tubuh, seperti kulit, tulang, sendi, paru-paru, dan aliran darah, serta dapat menyebabkan kondisi serius seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, sepsis, dan infeksi luka yang sulit disembuhkan (Gehrke et al., 2023).

Penyebaran MRSA yang semakin meluas dan kemampuan bakteri ini untuk mengembangkan resistensi terhadap hampir semua antibiotik yang ada saat ini membuatnya menjadi tantangan besar dalam dunia kedokteran dan kesehatan masyarakat (Vestergaard et al., 2019). Oleh karena itu, diperlukan upaya besar untuk mengatasi masalah ini, baik dalam hal pencegahan, diagnosis, maupun terapi. Pencarian agen antimikroba baru dengan mekanisme kerja berbeda menjadi sangat mendesak. Salah satu pendekatan inovatif yang sedang dikembangkan adalah pemanfaatan senyawa bioaktif hasil metabolisme mikroorganisme, termasuk enzim protease dan senyawa turunannya, serta pengembangan inhibitor molekuler yang dapat menargetkan protein penting dalam bakteri MRSA (Gagare et al., 2024; Mungwari et al., 2025). Inhibitor molekuler adalah senyawa atau ligan yang dapat berinteraksi dengan protein tertentu dalam bakteri, menghambat fungsinya, dan pada akhirnya mengganggu kelangsungan hidup bakteri tersebut (Yuan Liu et al., 2018).

Protease merupakan biokatalis yang berfungsi memecah ikatan peptida dalam protein dan banyak dihasilkan oleh mikroorganisme seperti *Bacillus*, *Streptomyces*, dan jamur *Ganoderma* (El-Gendi et al., 2021; Mahuri et al., 2023). Selain aktivitas enzimatisnya, protease juga dapat bertindak sebagai senyawa antimikroba secara langsung atau melalui senyawa kecil hasil biosintesis mikroba yang ikut dihasilkan dalam jalur metabolisme sekunder (Santos Aguilar & Sato, 2018). Oleh karena itu, identifikasi senyawa yang terkandung dalam fraksi hasil pemurnian protease menjadi penting untuk mengeksplorasi potensi bioaktivitas lainnya, seperti aktivitas terhadap MRSA.

Teknik Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) menjadi alat utama yang sangat sensitif dan selektif dalam mengidentifikasi senyawa-senyawa kecil maupun peptida yang terdapat dalam campuran kompleks seperti dialisat enzim (Alanazi, 2025; Grocholska et al., 2023; Kim et al., 2022). Analisis ini memungkinkan penentuan struktur molekul berdasarkan berat molekul dan pola fragmentasi ion, serta pencocokan dengan pustaka spektrum untuk identifikasi akurat (Grocholska et al., 2023; Robotham & Kelly, 2020; Xiao et al., 2012). Dalam konteks ini, LC-MS/MS digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada hasil pemurnian protease, yang selanjutnya dapat dievaluasi sebagai kandidat agen antibakteri baru.

Pengembangan inhibitor molekuler untuk MRSA memerlukan pemahaman mendalam tentang mekanisme biologi dan biokimia bakteri, serta pengetahuan tentang struktur dan fungsi protein-protein yang terlibat dalam proses infeksi (Yichen

Liu et al., 2025; Rosado et al., 2025). Salah satu pendekatan yang populer dan efektif adalah melalui teknik pemodelan komputasi, khususnya metode molekular docking (Adelusi et al., 2022; Agu et al., 2023; Stanzione et al., 2021). Teknik ini memungkinkan ilmuwan untuk memprediksi bagaimana suatu molekul (ligan) berinteraksi dengan protein target bakteri pada tingkat atomik (Crampon et al., 2022; Xue et al., 2025).

Molekular docking adalah metode komputasi yang digunakan untuk memodelkan interaksi antara molekul, terutama ligan dan protein (Agu et al., 2023; Angelo et al., 2024). Teknik ini mengandalkan simulasi berbasis komputer untuk memprediksi bagaimana suatu ligan berikatan dengan situs aktif pada protein target (Guterres & Im, 2020; Mondal & Chang, 2022). Dengan menggunakan molekular docking, para peneliti dapat mengidentifikasi afinitas pengikatan antara ligan dan protein, serta memetakan jenis interaksi yang terlibat, seperti ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, dan ikatan hidrofobik (Aguiar & Camps, 2025; Kumar & Kumar, 2019). Pendekatan molekular docking memberikan peluang besar untuk merancang senyawa terapeutik baru yang lebih spesifik dan efektif dalam mengatasi infeksi MRSA tanpa menimbulkan resistensi yang cepat (Pinzi & Rastelli, 2019; Zhang et al., 2025).

Penelitian ini menggunakan molekular docking untuk menganalisis interaksi beberapa ligan terpilih. Ligan tersebut meliputi Arginin, Lysine, Glutamic Acid, dan β -laktoglobulin. Target analisis adalah protein pada bakteri MRSA. Protein target mencakup empat struktur protein berbeda: 1MWR, 1MWT, 2IWC, dan 2IWD. Seluruh struktur protein diunduh dari database Protein Data Bank (PDB). Keempat protein tersebut mewakili enzim atau reseptor penting bagi kelangsungan hidup bakteri. Protein-protein ini berpotensi menjadi target terapeutik pengembangan pengobatan infeksi MRSA.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeskripsikan proses identifikasi senyawa dari hasil pemurnian enzim protease menggunakan LC-MS/MS, menganalisis interaksi molekul antara ligan dan protein target MRSA melalui molekular docking, serta mengevaluasi potensi setiap protein target sebagai kandidat inhibitor dalam pengobatan infeksi MRSA.

4.3 Metode penelitian

4.3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juli 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Ilmu Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

4.3.2 Alat dan bahan

Perangkat lunak yang digunakan untuk molekular docking dan analisis interaksi molekular mencakup AutoDock Vina atau AutoDock 4.2, PyMOL atau UCSF Chimera, Discovery Studio Visualizer atau BIOVIA Discovery Studio Client, AutoDockTools, dan Swiss-PdbViewer atau DeepView. Peralatan untuk LC-MS/MS meliputi HPLC (High

Performance Liquid Chromatography) atau UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography), autosampler, column oven, detektor UV-Vis atau diode array detector (DAD), sistem MS/MS seperti Triple Quadrupole (QqQ), Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF), Orbitrap, atau Ion Trap, sumber ionisasi Electrospray Ionization (ESI) atau Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), kolom C18 dengan ukuran partikel 1,8–5 μm , syringe filter dengan ukuran pori 0,22 μm atau 0,45 μm berbahan PTFE, Nylon, atau PVDF, sentrifugasi, vortex mixer, sonikator, rotary evaporator, timbangan analitik, pH meter, mikropipet, vial LC-MS, dan freezer -20 °C dan -80 °C. Perangkat lunak untuk akuisisi dan analisis data LC-MS/MS meliputi Xcalibur (Thermo Fisher), MassLynx (Waters), Analyst (Sciex), MassHunter (Agilent), Compound Discoverer, MetaboAnalyst, MZmine, NIST MS Library, METLIN, MassBank, atau mzCloud.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua kategori utama, yaitu bahan untuk studi *in silico* molecular interaction dan bahan untuk identifikasi senyawa menggunakan LC-MS/MS. Untuk studi *in silico*, struktur tiga dimensi protein target dari MRSA diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) yang dapat diakses melalui situs <https://www.rcsb.org>, dengan memilih struktur kristal yang memiliki resolusi tinggi ($<2,5 \text{ \AA}$), coverage lengkap, dan R-factor rendah untuk menjamin kualitas struktur. Protein target yang relevan untuk MRSA meliputi Penicillin-Binding Protein 2a (PBP2a) dengan kode PDB seperti 1VQQ atau 3ZG0, sortase A (SrtA) dengan kode PDB seperti 1IJA atau 1T2P, DNA gyrase atau topoisomerase IV, serta protein lain yang terlibat dalam virulensi seperti alpha-hemolysin, protein A, atau clumping factor.

Struktur ligan atau senyawa kandidat yang akan diuji interaksinya dengan protein target MRSA diperoleh dari berbagai sumber database kimia, meliputi PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>), ZINC Database (<https://zinc.docking.org>), DrugBank (<https://www.drugbank.ca>), serta ChemSpider. Sebagai kontrol positif dalam molekular docking, digunakan struktur senyawa antibiotik yang telah diketahui aktif terhadap MRSA seperti vancomycin, linezolid, daptomycin, tigecycline, atau ceftaroline. Sekuens asam amino protein target diperlukan jika struktur kristal tidak tersedia dan perlu dilakukan *homology modeling*, yang dapat diperoleh dari database UniProt (<https://www.uniprot.org>) atau GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Untuk identifikasi senyawa hasil pemurnian protease menggunakan LC-MS/MS, sampel utama yang dianalisis adalah enzim protease yang telah dipurifikasi dari bakteri laut melalui berbagai tahap kromatografi. Standar protein dan peptida diperlukan sebagai referensi untuk validasi metode dan identifikasi fragmen, yang meliputi Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar protein utuh, protein marker atau ladder untuk estimasi berat molekul dalam rentang 10–250 kDa, serta standar peptida seperti bradykinin, angiotensin, atau peptida sintetik lain untuk kalibrasi massa dan validasi fragmentasi.

4.4 Prosedur penelitian

Prosedur simulasi docking ligand terhadap protein target MRSA. Langkah pertama dalam simulasi docking adalah mempersiapkan struktur reseptor dan ligand yang akan diuji. Berdasarkan hasil analisis interaksi molekul sebelumnya, reseptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein target dari bakteri MRSA dengan kode PDB 2IWD, 2IWC, dan 1MWR. Struktur ketiga protein ini diunduh dari server PDB melalui tautan 2IWD, 2IWC, dan 1MWR, kemudian dipersiapkan menggunakan Biovia Discovery Studio 2021. Persiapan ini mencakup optimasi struktur melalui penghapusan molekul air, penambahan hidrogen polar, dan minimalisasi energi untuk memastikan struktur protein dalam keadaan stabil. Di sisi lain, struktur ligand (Arginin, Lysine, Glutamic Acid, dan β -lactoglobulin) diperoleh dari basis data PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) dan diunduh dalam format SDF atau PDB.

Simulasi docking dilakukan menggunakan aplikasi PyRx dengan memilih mode Vina Wizard sebagai antarmuka utama. Langkah pertama adalah mengunggah berkas protein target (2IWD.pdb, 2IWC.pdb, dan 1MWR.pdb) serta berkas ligand dalam format .pdb. Setelah berkas berhasil diunggah, PyRx secara otomatis mengonversi berkas protein dan ligand tersebut ke dalam format PDBQT, yang merupakan format standar yang diperlukan oleh AutoDock Vina untuk simulasi docking. Langkah selanjutnya adalah menentukan area pencarian yang dikenal sebagai grid box, yang berfungsi sebagai batas ruang interaksi antara ligand dan situs aktif protein. Untuk protein 2IWD, situs aktif meliputi residu LYS437, THR529, dan LYS528; sedangkan untuk 2IWC, interaksi terjadi di sekitar residu THR529, SER439, ASN441, dan GLU569. Sementara itu, pada protein 1MWR, area situs aktif berada di sekitar residu CYS145, GLY143, dan HIS163. Penentuan grid box yang tepat bertujuan untuk mencakup seluruh area target sehingga simulasi dapat berlangsung secara optimal.

Grid box ditentukan terlebih dahulu sebelum memulai proses docking. Proses docking dimulai dengan menekan tombol "Start" pada PyRx. Simulasi menghasilkan skor afinitas pengikatan dalam satuan energi (kkal/mol). Nilai lebih negatif menunjukkan interaksi lebih kuat dan stabil antara ligan dan protein. Hasil docking disimpan dalam format PDBQT. Hasil tersebut diekspor sebagai PDB untuk analisis lanjutan menggunakan BIOVIA Discovery Studio. Aplikasi ini memudahkan visualisasi ikatan hidrogen, elektrostatik, dan hidrofobik antara ligan dan protein target. Residu kunci yang terlibat dalam pengikatan dapat diidentifikasi melalui aplikasi ini.

Prosedur simulasi docking molekul Netropsin terhadap protein target MRSA. Langkah awal dalam simulasi docking ini dimulai dengan mempersiapkan struktur reseptor dan ligan yang akan digunakan. Reseptor dalam penelitian ini adalah protein target dari bakteri Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), yaitu protein dengan kode PDB 2IWD, 2IWC, 1MWR, dan 1MWT. Keempat struktur protein ini diunduh dari basis data Protein Data Bank (PDB) melalui laman <https://www.rcsb.org>,

kemudian dilakukan proses preparasi menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio 2021. Proses preparasi ini meliputi penghapusan molekul air yang tidak diperlukan, penambahan atom hidrogen polar, serta minimalisasi energi menggunakan parameter default, sehingga struktur protein berada pada kondisi yang stabil untuk simulasi interaksi molekul.

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa Netropsin (Congocidin). Senyawa tersebut diunduh dari basis data PubChem (CID: 441139) dalam format SDF atau PDB. Struktur ligan dikonversi dan dioptimasi strukturnya. Optimasi meliputi penambahan atom hidrogen dan penyesuaian konformasi. Struktur ligan kemudian dikonversi ke format PDBQT melalui aplikasi PyRx. Simulasi docking dilakukan menggunakan perangkat lunak PyRx dengan antarmuka AutoDock Vina Wizard. Berkas protein (2IWD.pdb, 2IWC.pdb, 1MWR.pdb, dan 1MWT.pdb) dan ligan Netropsin diunggah terlebih dahulu. PyRx secara otomatis mengonversi semua berkas menjadi format PDBQT. Format PDBQT merupakan format standar untuk menjalankan simulasi dengan AutoDock Vina

Langkah penting berikutnya adalah penentuan area pencarian atau grid box, yang mendefinisikan ruang interaksi antara ligan dan situs aktif dari masing-masing protein. Untuk protein 2IWD, residu penting berada di sekitar LYS437, THR529, dan LYS528. Pada protein 2IWC, interaksi dipusatkan di sekitar residu THR529, SER439, ASN441, dan GLU569. Sedangkan untuk protein 1MWR, situs aktif berada pada residu CYS145, GLY143, dan HIS163. Sementara itu, protein 1MWT, yang juga merupakan domain penting dari penicillin-binding protein (PBP), memiliki residu kunci seperti GLY292, SER294, GLU296, dan ALA297. Penentuan grid box ini dilakukan secara hati-hati agar mencakup seluruh area situs aktif, memastikan bahwa ligan dapat berinteraksi secara maksimal selama simulasi.

Semua parameter ditentukan sebelum memulai proses docking. Proses docking dimulai dengan menjalankan simulasi pada PyRx. Hasil proses berupa nilai afinitas pengikatan (binding affinity) dalam satuan energi (kkal/mol). Nilai lebih negatif menunjukkan interaksi lebih kuat dan stabil antara ligan Netropsin dan protein target MRSA. Hasil docking disimpan dan diekspor dalam format PDB untuk analisis lanjutan. Analisis lanjutan menggunakan BIOVIA Discovery Studio. Aplikasi ini digunakan untuk memvisualisasikan jenis interaksi molekul. Interaksi molekul meliputi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan interaksi elektrostatik antara ligan dan protein. Residu kunci yang berperan dalam proses pengikatan dapat diidentifikasi melalui aplikasi ini. Potensi Netropsin sebagai agen antimikroba terhadap MRSA dapat dianalisis secara mendalam melalui pendekatan ini. Analisis didasarkan pada kekuatan interaksi molekuler yang terjadi.

4.5 Hasil dan pembahasan

4.5.1 Interaksi molekul MRSA protein 1MWR

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan patogen berbahaya yang resisten terhadap berbagai antibiotik, termasuk methicillin, sehingga infeksi

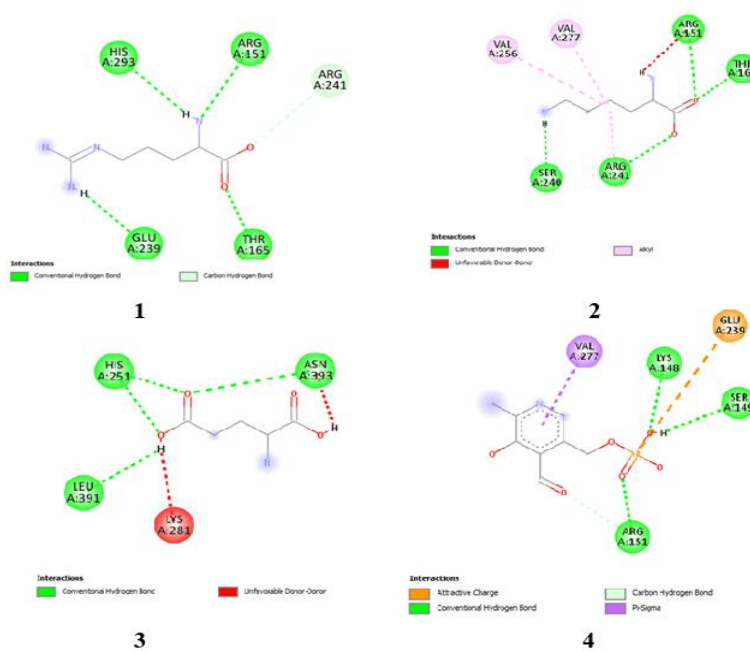
sulit diobati dan menimbulkan tantangan serius dalam bidang medis. Resistensi MRSA terhadap antibiotik konvensional mendorong pengembangan pendekatan terapeutik baru, salah satunya melalui analisis interaksi molekul (molecular interaction) menggunakan metode molekular docking. Teknik ini memodelkan interaksi antara molekul kecil (ligand) dengan target biologis (protein) untuk memprediksi afinitas pengikatan dan stabilitas kompleks yang terbentuk. Salah satu target protein penting dari MRSA yang digunakan dalam studi ini adalah 1MWR. Protein 1MWR berperan dalam mekanisme seluler penting pada MRSA, sehingga menghambat aktivitasnya berpotensi mengganggu fungsi vital bakteri dan menjadi strategi terapi yang efektif.

Penelitian ini menganalisis interaksi protein 1MWR terhadap beberapa ligan. Ligan tersebut meliputi Arginin, Lysine, Glutamic Acid, dan β -laktoglobulin (**Gambar 4.1**). Arginin merupakan asam amino esensial yang memiliki gugus amina. Gugus amina mampu membentuk ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik kuat dengan residu protein. Lysine merupakan asam amino basa. Lysine dapat meningkatkan stabilitas interaksi melalui ikatan elektrostatik dengan sisi bermuatan negatif pada protein. Glutamic Acid merupakan asam amino bermuatan negatif. Asam amino ini cenderung berinteraksi dengan residu bermuatan positif pada situs aktif protein. Interaksi tersebut membentuk ikatan ionik yang kuat. β -laktoglobulin merupakan protein globular. Protein ini dapat berinteraksi melalui permukaan hidrofobik dan ikatan hidrogen. Interaksi tersebut memperkuat stabilitas kompleks yang terbentuk.

Pemilihan Arginin, Lysine, dan Glutamic Acid sebagai ligan didasarkan pada fakta bahwa ketiganya merupakan hasil hidrolisis enzim protease. Proses hidrolisis oleh protease menghasilkan asam amino bebas dari rantai polipeptida, termasuk Arginin, Lysine, dan Glutamic Acid, yang dikenal memiliki aktivitas biologis dan potensi sebagai agen terapeutik. Hidrolisis ini memutus ikatan peptida, menghasilkan asam amino dalam bentuk yang lebih sederhana dan aktif secara biokimia. Selain itu, ketiga asam amino tersebut berperan penting dalam mekanisme interaksi molekuler, seperti pembentukan ikatan hidrogen dan elektrostatik dengan residu aktif pada protein target, termasuk protein 1MWR.

β -laktoglobulin dipilih karena merupakan protein globular utama yang ditemukan dalam whey. Whey merupakan bagian cair dari susu setelah proses penggumpalan. Proses hidrolisis enzimatis menggunakan protease dapat dilakukan pada β -laktoglobulin. Proses ini menghasilkan peptida bioaktif yang memiliki potensi penghambatan terhadap patogen. Patogen meliputi MRSA. Fragmen peptida yang dihasilkan mampu berinteraksi dengan protein target melalui ikatan hidrofobik dan hidrogen. Interaksi ini meningkatkan afinitas pengikatan pada situs aktif protein. Pemahaman mengenai interaksi ini penting dalam desain obat berbasis peptida dan asam amino. Pemahaman ini diperlukan khususnya dalam upaya menghambat aktivitas protein esensial dari MRSA.

A



Gambar 4.1. Interaksi molekul protein target bakteri MRSA Protein 1MWR (A1; Arginin, A2; Lysine, A3; Glutamic Acid, A4; β -lactoglobulin)

Proses molekular docking dilakukan untuk memahami interaksi setiap ligan dengan situs aktif pada protein 1MWR. Situs aktif diidentifikasi pada residu CYS145, GLY143, dan HIS163. Lokasi ini dianggap krusial sebagai titik ikatan (binding site) utama. Titik ikatan utama menentukan efektivitas penghambatan terhadap aktivitas biologis protein. Ligan dengan afinitas pengikatan tertinggi terhadap protein 1MWR diharapkan dapat diidentifikasi melalui pendekatan ini. Afinitas tertinggi ditandai dengan nilai energi pengikatan (binding energy) paling rendah. Hasil ini dapat menjadi dasar pengembangan kandidat obat baru yang efektif melawan infeksi MRSA. Mekanisme penghambatan dilakukan melalui protein esensial bakteri.

Gambar 4.1 menunjukkan interaksi molekul antara ligan dan residu protein target MRSA pada empat panel berbeda. Panel tersebut meliputi Arginin (A1), Lysine (A2), Glutamic Acid (A3), dan β -laktoglobulin (A4). Panel 1 (Arginin - A1) menunjukkan interaksi utama berupa ikatan hidrogen konvensional. Ikatan hidrogen terbentuk dengan residu ARG A:151, ARG A:241, GLU A:239, THR A:165, dan HIS A:293. Ikatan hidrogen karbon (Carbon Hydrogen Bond) turut menjaga stabilitas ligan di situs aktif. Ikatan hidrogen berperan penting dalam memperkuat afinitas ligan terhadap protein target.

Panel 2 (Lysine - A2) menunjukkan interaksi dominan berupa ikatan hidrogen konvensional. Ikatan hidrogen terbentuk dengan residu SER A:149, VAL A:277, dan ARG A:151. Interaksi hidrofobik terbentuk melalui ikatan alkil dengan VAL A:256 dan VAL A:277. Interaksi elektrostatik ditandai dengan attractive charge antara GLU A:239 dan LYS A:148. Kombinasi interaksi hidrogen dan elektrostatik meningkatkan stabilitas kompleks di dalam situs aktif protein.

Panel 3 (Glutamic Acid - A3) menunjukkan ikatan hidrogen konvensional dengan residu HIS A:251, ASN A:393, dan LEU A:391, yang berperan dalam memperkuat pengikatan ligan. Namun, terdapat satu interaksi yang tidak menguntungkan, yaitu Unfavorable Donor-Donor antara Glutamic Acid dan LYS A:281, yang mengindikasikan adanya repulsi elektrostatik yang dapat mengurangi afinitas ligan terhadap protein.

Panel 4 (β -laktoglobulin - A4) menunjukkan interaksi berupa ikatan hidrogen konvensional. Ikatan hidrogen terbentuk dengan residu ARG A:151, SER A:149, dan LYS A:148. Interaksi π -sigma terbentuk dengan VAL A:277. Interaksi attractive charge terbentuk dengan GLU A:239. Ikatan hidrogen karbon memperkuat stabilitas kompleks ligan-protein. Kombinasi interaksi hidrogen, elektrostatik, dan hidrofobik menunjukkan β -laktoglobulin mampu berikatan kuat di situs aktif protein MRSA. Keempat panel tersebut mengilustrasikan interaksi ligan dengan residu penting di situs aktif protein target MRSA secara keseluruhan. Interaksi terjadi melalui beragam jenis ikatan. Jenis ikatan meliputi ikatan hidrogen, hidrofobik, dan elektrostatik. Peran kunci dimainkan oleh interaksi ini dalam menentukan stabilitas dan afinitas ligan terhadap protein. Stabilitas dan afinitas berimplikasi pada efektivitas penghambatan aktivitas biologis MRSA oleh molekul-molekul tersebut.

4.5.2 Interaksi molekul MRSA protein 2IWD

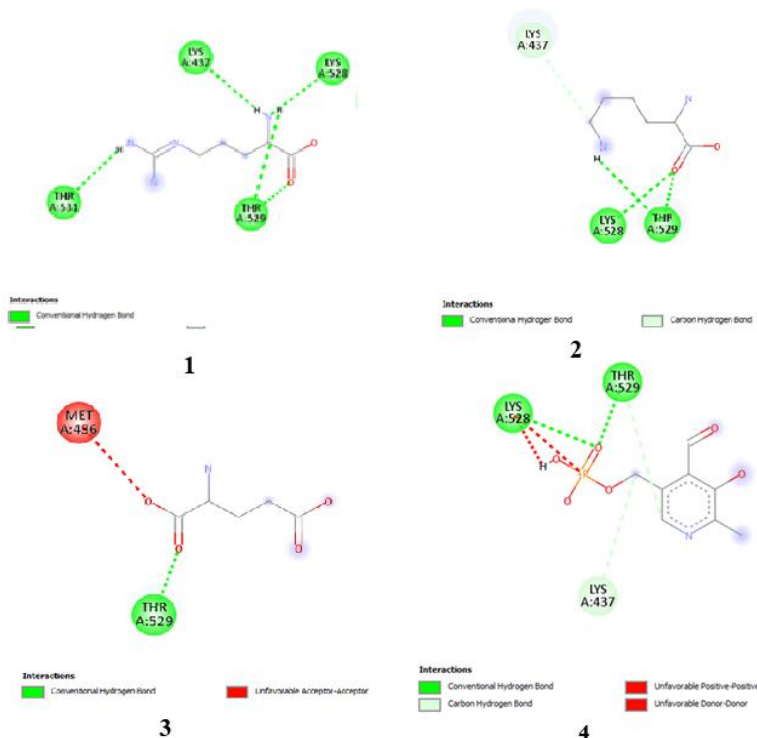
Penelitian ini memilih protein 2IWD sebagai salah satu protein target untuk dianalisis. Protein 2IWD merupakan enzim penting dalam mekanisme seluler MRSA. Enzim ini berperan dalam regulasi dan fungsi metabolisme bakteri. Penghambatan aktivitas protein ini dapat mengganggu proses vital MRSA. Protein ini menjadi target potensial dalam pengembangan agen antibakteri.

Proses molekular docking dilakukan untuk memahami interaksi ligan dengan situs aktif pada protein 2IWD. Situs aktif diidentifikasi pada residu LYS437, THR529, dan LYS528 (Gambar 4.2). Situs aktif ini dianggap krusial karena berperan dalam aktivitas katalitik dan pengikatan substrat. Hasil simulasi docking menunjukkan setiap ligan memiliki afinitas pengikatan berbeda. Afinitas ditandai dengan nilai energi (binding energy) yang bervariasi. Nilai energi lebih negatif menunjukkan interaksi ligan dengan protein target lebih kuat. Nilai energi negatif mengindikasikan potensi penghambatan lebih besar terhadap aktivitas biologis protein 2IWD.

Pola interaksi ini dipahami untuk mengidentifikasi kandidat ligan paling efektif dalam menghambat aktivitas protein 2IWD. Hasil penelitian dapat menjadi dasar pengembangan terapi baru untuk melawan infeksi MRSA yang resisten terhadap antibiotik konvensional. **Gambar 4.2** menunjukkan interaksi molekul antara beberapa

ligan dengan residu pada protein target MRSA. Ligan meliputi Arginin, Lysine, Glutamic Acid, dan β -laktoglobulin pada Protein 2IWD. Panel 1 (Arginin - B1) menunjukkan Arginin berinteraksi melalui ikatan hidrogen konvensional. Ikatan terbentuk dengan residu LYS A:437, LYS A:528, THR A:534, dan THR A:529. Ikatan hidrogen berperan penting dalam menjaga stabilitas dan meningkatkan afinitas ligan pada situs aktif Protein 2IWD. Panel 2 (Lysine - B2) menunjukkan Lysine berinteraksi melalui ikatan hidrogen konvensional. Ikatan terbentuk dengan residu LYS A:437, LYS A:528, dan THR A:529. Interaksi Carbon Hydrogen Bond memperkuat orientasi dan stabilitas pengikatan di situs aktif.

B



Gambar 4.2. Interaksi molekul protein targt bakteri MRSA Protein 2IWD (B1; Arginin, B2; Lysine, B3; Glutamic Acid, B4; β -laktoglobulin)

Panel 3 (Glutamic Acid - B3) menunjukkan Glutamic Acid berikatan dengan THR A:529 melalui ikatan hidrogen konvensional. Interaksi tidak menguntungkan berupa Unfavorable Acceptor-Acceptor terdapat dengan MET A:496. Interaksi ini berpotensi menurunkan stabilitas pengikatan karena adanya repulsi elektrostatis. Panel 4 (β -laktoglobulin - B4) menunjukkan interaksi berupa ikatan hidrogen konvensional dengan THR A:529 dan LYS A:528. Carbon Hydrogen Bond terbentuk dengan residu tertentu. Interaksi tidak menguntungkan terdapat yaitu Unfavorable Positive-Positive dengan LYS A:437. Unfavorable Donor-Donor terdapat dengan LYS A:528. Interaksi

tidak menguntungkan ini dapat mengganggu stabilitas kompleks akibat repulsi elektrostatik.

4.5.3 Interaksi molekul MRSA protein 2IWC

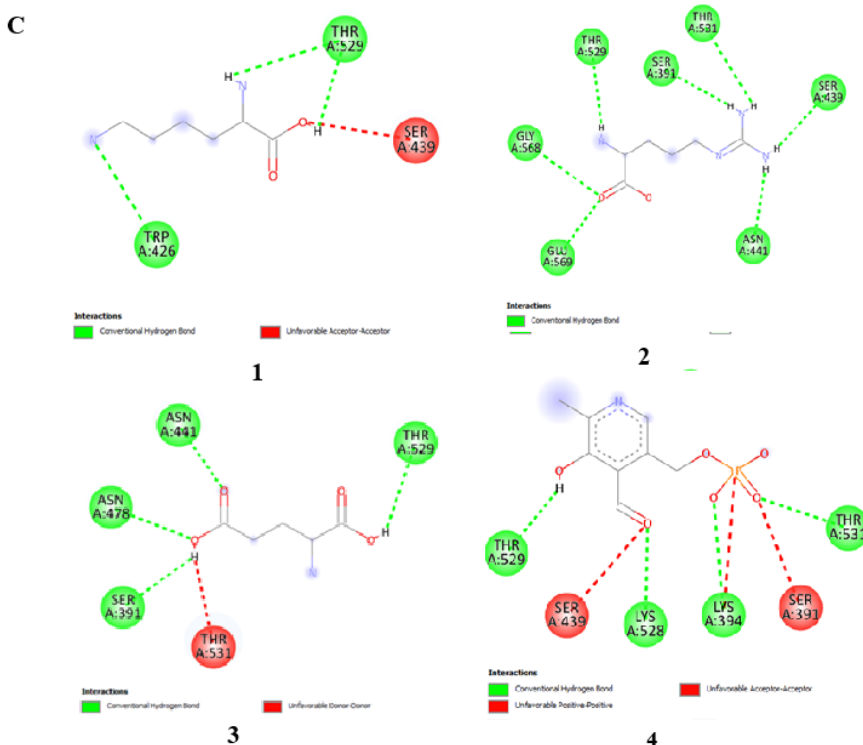
Salah satu protein target yang dianalisis dalam penelitian ini adalah 2IWC. Protein 2IWC merupakan enzim esensial yang berperan penting dalam proses metabolisme dan regulasi seluler pada MRSA. Menghambat fungsi protein ini diharapkan dapat mengganggu mekanisme pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri, sehingga berpotensi menjadi target terapi yang efektif.

Interaksi protein 2IWC dianalisis terhadap beberapa ligand, yaitu Arginin, Lysine, Glutamic Acid, dan β -lactoglobulin. Arginin adalah asam amino esensial yang memiliki gugus amina, yang memungkinkannya membentuk ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik dengan residu bermuatan negatif pada protein. Lysine, sebagai asam amino basa, cenderung berikatan dengan situs bermuatan negatif melalui interaksi elektrostatik, meningkatkan stabilitas kompleks.

Glutamic Acid, yang bermuatan negatif, berpotensi berinteraksi dengan residu positif pada protein, menghasilkan ikatan ionik yang kuat. Sementara itu, β -lactoglobulin adalah protein globular yang memiliki kapasitas untuk membentuk interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen pada situs aktif protein, memperkuat stabilitas dan afinitas pengikatan.

Pada **Gambar 4.3** menunjukkan interaksi molekul antara Arginin, Lysine, Glutamic Acid, dan β -lactoglobulin dengan residu pada protein target MRSA, yaitu Protein 2IWC. Pada interaksi Arginin (C1), terlihat adanya ikatan hidrogen konvensional yang signifikan dengan residu TRP A:426 dan THR A:529, yang berperan dalam meningkatkan afinitas ligan terhadap situs aktif Protein 2IWC. Namun, interaksi tidak menguntungkan berupa Unfavorable Acceptor-Acceptor dengan residu SER A:439 menunjukkan adanya repulsi elektrostatik yang dapat mengganggu stabilitas pengikatan. Sementara itu, interaksi Lysine (C2) didominasi oleh ikatan hidrogen konvensional dengan beberapa residu penting seperti THR A:529, SER A:531, SER A:433, GLY A:568, GLU A:569, dan ASN A:444, tanpa adanya interaksi tidak menguntungkan, sehingga memperkuat kestabilan kompleks yang terbentuk.

Pada interaksi Glutamic Acid (C3), terdapat ikatan hidrogen dengan residu ASN A:441, ASN A:478, SER A:391, dan THR A:529, yang menandakan kestabilan pengikatan, meskipun terdapat gangguan berupa Unfavorable Donor-Donor dengan residu THR A:531, yang berpotensi menurunkan afinitas. Di sisi lain, β -lactoglobulin (C4) menunjukkan beberapa interaksi hidrogen konvensional dengan THR A:529 dan THR A:531, namun juga terdapat interaksi tidak menguntungkan berupa Unfavorable Positive-Positive dengan residu LYS A:394 dan LYS A:528, serta Unfavorable Acceptor-Acceptor dengan SER A:439 dan SER A:391, yang dapat menyebabkan repulsi dan memengaruhi kestabilan kompleks yang terbentuk.



Gambar 4.3. Interaksi molekul protein target bakteri MRSA Protein 2IWC (C1; Arginin, C2; Lysine, C3; Glutamic Acid, C4; β -lactoglobullin)

Secara keseluruhan, interaksi yang terjadi menunjukkan bahwa Lysine memiliki potensi pengikatan terbaik pada Protein 2IWC, diikuti oleh Arginin dan Glutamic Acid, sedangkan β -lactoglobullin tampak mengalami gangguan repulsi yang cukup signifikan.

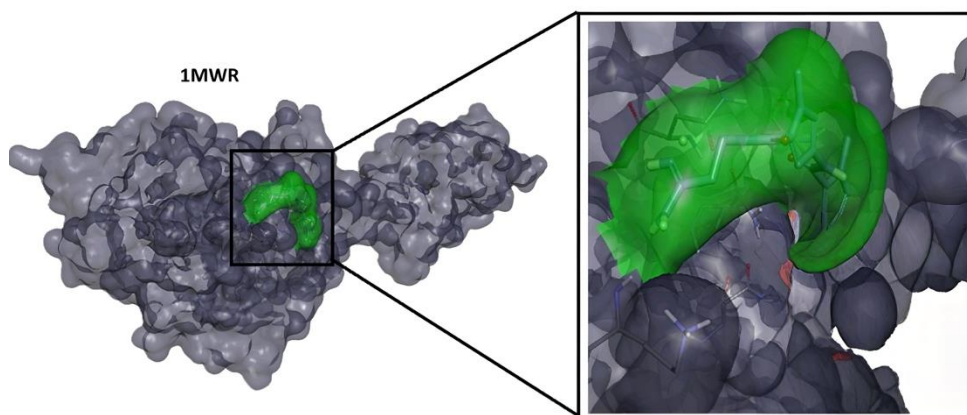
Secara keseluruhan, Lysine menunjukkan afinitas terbaik pada ketiga protein, terutama pada 2IWD dan 2IWC, di mana ikatan hidrogen stabil terbentuk tanpa banyak interaksi tidak menguntungkan. Pada 2IWA, meskipun interaksi hidrogen terbentuk, terdapat repulsi yang mengurangi stabilitas. Untuk β -lactoglobullin, interaksi terbaik terlihat pada 2IWA, sementara pada 2IWD dan 2IWC terjadi banyak repulsi elektrostatis. Berdasarkan analisis ini, Protein 2IWD memiliki afinitas terbaik dan interaksi yang paling stabil, khususnya terhadap Lysine dan Arginin, sehingga dianggap paling cocok sebagai target inhibisi terhadap MRSA.

4.5.4 Hasil identifikasi senyawa menggunakan metode LC-MS/MS

Identifikasi senyawa hasil pemurnian protease bakteri *S. algae* dilakukan menggunakan metode Liquid Chromatography–Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) untuk mengkarakterisasi komponen aktif yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Salah satu senyawa yang terdeteksi pada analisis ini adalah senyawa Congocidin (Netropsin), yang muncul sebagai senyawa ke-108 dalam laporan LC-MS/MS.

Netropsin teridentifikasi dengan formula molekul $C_{18}H_{26}N_{10}O_3$ dan ion spesies utama $[(M+H)^+]$ dengan nilai m/z 431, serta waktu retensi (RT) sebesar 5,549 menit. Massa molekul yang terdeteksi adalah 430,2181 Da. Identifikasi ini memiliki skor keakuratan (Score DB) sebesar 96,35, menunjukkan kecocokan tinggi dengan pustaka senyawa yang tersedia dalam database instrumen. Perbedaan antara massa teoritis dan massa terukur sangat kecil, yaitu hanya sekitar 1,98257 mDa ($-0,85$ ppm), yang memperkuat validitas identifikasi tersebut. Netropsin atau congocidin adalah senyawa antibiotik dari golongan poliamida minor groove binders yang diketahui mampu berikatan dengan DNA bakteri dan menghambat proses transkripsi dan replikasi. Dalam konteks ini, deteksi Netropsin pada fraksi hasil pemurnian protease mengindikasikan adanya potensi aktivitas antibakteri, terutama terhadap MRSA, yang dapat dieksplorasi lebih lanjut melalui studi interaksi molekular. Untuk mendalami mekanisme interaksi, dilakukan studi molekular docking antara Netropsin dan protein target MRSA dengan kode PDB 2IWD, 2IWC, 1MWR, dan 1MWT. Hasil docking menunjukkan bahwa Netropsin mampu membentuk ikatan dengan situs aktif dari keempat protein target tersebut, dengan afinitas pengikatan yang signifikan. Ikatan-ikatan yang terbentuk meliputi interaksi hidrogen dan hidrofobik yang stabil, menunjukkan bahwa Netropsin memiliki potensi sebagai kandidat inhibitor untuk pengembangan terapi antibakteri terhadap MRSA.

4.4.5 Hasil analisis interaksi molekular protein-protein MRSA dengan Netropsin



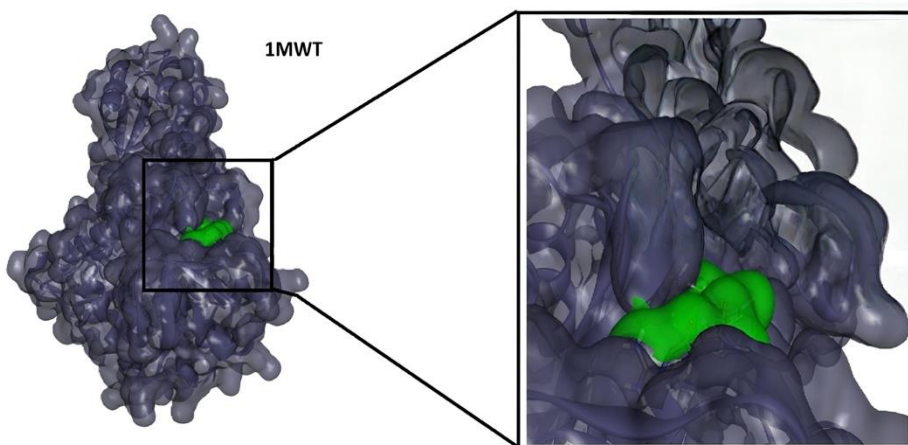
**Gambar 4.4 Interaksi molekular protein target bakteri MRSA
Protein 1MWR x Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$)**

Tabel 4.1 Hasil analisis interaksi molekul 1MWR x Netropsin

Interaksi ikatan	Jarak ikatan	Jenis ikatan
A:ASN540:HD22 - N:UNK1:O	2.26	Hydrogen Bond
A:ASN543:HD22 - N:UNK1:O	2.81	Hydrogen Bond
A:ASN545:HD22 - N:UNK1:O	2.06	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:ASN561:OD1	1.87	Hydrogen Bond
N:UNK1 - A:VAL557	4.99	Hydrophobic

Interaksi molekul antara protein target MRSA dengan kode PDB 1MWR dan ligan Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$) menunjukkan hasil yang sangat signifikan berdasarkan analisis molekular docking. Netropsin, yang dikenal sebagai senyawa pengikat alur kecil DNA, dalam penelitian ini diidentifikasi sebagai salah satu senyawa hasil pemurnian protease melalui LC-MS/MS dan dianalisis lebih lanjut potensinya sebagai penghambat protein MRSA. Hasil docking memperlihatkan bahwa Netropsin mampu berikatan dengan kuat dan spesifik pada beberapa residu aktif di dalam protein 1MWR. Terdapat empat interaksi hidrogen yang terbentuk antara gugus oksigen atau hidrogen dari Netropsin dengan residu ASN540, ASN543, ASN545, dan ASN561. Jarak ikatan yang terbentuk berkisar antara 1,87 Å hingga 2,81 Å, menandakan interaksi yang kuat dan stabil. Ikatan terpendek terjadi antara hidrogen dari Netropsin dan oksigen karbonil (OD1) pada residu ASN561 dengan jarak hanya 1,87 Å, yang mencerminkan kekuatan afinitas yang tinggi dan berperan penting dalam menstabilkan kompleks. Selain itu, juga terdapat satu interaksi hidrofobik jenis Pi-Alkyl antara Netropsin dan residu VAL557 pada jarak 4,99 Å, yang memperkuat retensi ligan dalam kantong aktif protein.

Visualisasi interaksi mendukung temuan ini dengan menunjukkan dominasi ikatan hidrogen konvensional yang digambarkan dalam warna hijau, serta satu interaksi hidrofobik dan satu interaksi tidak menguntungkan (unfavorable donor–donor) yang ditandai warna merah, meskipun pengaruhnya tidak signifikan terhadap kestabilan keseluruhan kompleks. Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa Netropsin memiliki kemampuan berikatan secara spesifik dengan residu penting protein 1MWR, sehingga berpotensi besar mengganggu fungsi biologis protein tersebut. Hal ini membuka peluang pemanfaatan Netropsin sebagai kandidat inhibitor protein penting MRSA dan mendukung upaya pengembangan agen antibakteri baru berbasis mekanisme pengikatan molekuler yang kuat dan selektif.



**Gambar 4.5 Interaksi molekul protein target bakteri MRSA
Protein 1MWT x Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$)**

Tabel 4.2 Hasil analisis interaksi molekul 1MWT x Netropsin

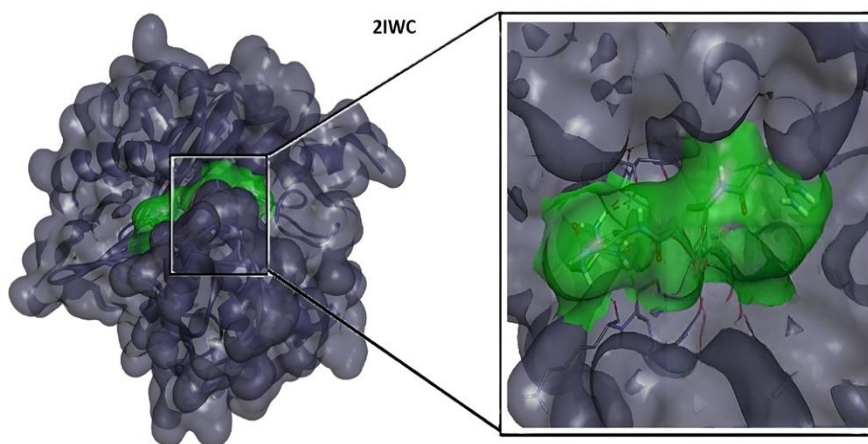
Interaksi ikatan	Jarak ikatan	Jenis ikatan
A:SER400:HN - N:UNK1:N	2.93	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:GLN521:O	2.25	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:THR444:O	2.58	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:TYR519:OH	2.00	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:SER400:O	2.88	Hydrogen Bond
A:SER400:CB - N:UNK1:O	3.53	Hydrogen Bond

Hasil analisis interaksi molekul antara protein target MRSA dengan kode PDB 1MWT dan ligan Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$) menunjukkan adanya ikatan yang kuat dan spesifik, yang berpotensi menghambat fungsi biologis protein tersebut. Dari hasil molekular docking, teridentifikasi enam interaksi utama yang seluruhnya merupakan ikatan hidrogen, yang berkontribusi signifikan terhadap kestabilan kompleks ligan-protein. Interaksi pertama terjadi antara gugus HN dari residu SER400 dan gugus nitrogen dari Netropsin dengan jarak 2,93 Å. Selain itu, terdapat beberapa interaksi hidrogen yang melibatkan gugus donor hidrogen dari Netropsin terhadap gugus akseptor oksigen dari residu GLN521 (2,25 Å), THR444 (2,58 Å), dan TYR519 (2,00 Å). Ikatan dengan TYR519 menjadi salah satu yang paling kuat, karena memiliki jarak terpendek di antara semua interaksi yang diamati.

Lebih lanjut, Netropsin juga membentuk ikatan hidrogen dengan gugus oksigen dari residu SER400 dengan jarak 2,88 Å, serta interaksi tambahan antara karbon beta dari SER400 dan gugus oksigen pada Netropsin dengan jarak 3,53 Å. Walaupun ikatan ini lebih lemah, tetap berkontribusi terhadap orientasi dan retensi ligan dalam kantong aktif protein. Gambar visualisasi interaksi menunjukkan dominasi ikatan hidrogen konvensional (garis hijau), serta satu interaksi yang ditandai merah sebagai unfavorable donor–donor, namun tidak signifikan dalam memengaruhi keseluruhan kestabilan kompleks.

Secara keseluruhan, banyaknya interaksi hidrogen dengan jarak pendek dan spesifik menunjukkan bahwa Netropsin mampu berikatan kuat dan stabil dengan protein 1MWT, serta memiliki potensi tinggi sebagai agen penghambat aktivitas protein target MRSA.

Interaksi molekul antara protein target MRSA dengan kode PDB 2IWC dan ligan Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$) menunjukkan keterikatan yang kuat melalui beberapa ikatan utama yang teridentifikasi dalam analisis molekular docking. Hasil simulasi menunjukkan bahwa Netropsin membentuk dua ikatan hidrogen konvensional yang signifikan, yaitu antara gugus donor hidrogen dari Netropsin dengan gugus oksigen dari residu LYS437 dengan jarak 2,07 Å, serta dengan residu MET436 pada jarak 1,84 Å, yang merupakan ikatan paling kuat di antara semuanya. Kedua interaksi ini menunjukkan kontribusi besar terhadap stabilitas dan posisi ligan di dalam kantong aktif protein.



**Gambar 4.6 Interaksi molekul protein target bakteri MRSA
Protein 2IWC x Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$)**

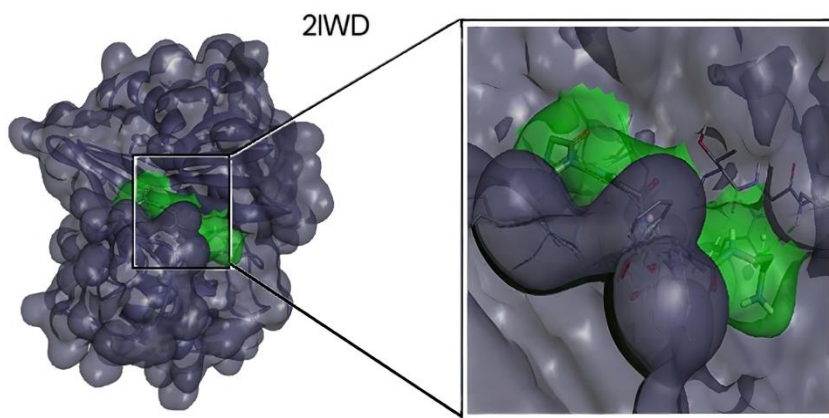
Tabel 4.3 Hasil analisis interaksi molekul 2IWC x Netropsin

Interaksi ikatan	Jarak ikatan	Jenis ikatan
N:UNK1:H - A:LYS437:O	2.07	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:MET436:O	1.84	Hydrogen Bond

A:SER439:CB - N:UNK1:O	3.61	Hydrogen Bond
N:UNK1:C - A:PHE423	3.75	Hydrophobic

Selain itu, juga terdapat interaksi antara gugus karbon beta dari residu SER439 dengan gugus oksigen dari Netropsin dengan jarak 3,61 Å, yang tergolong sebagai ikatan hidrogen karbon. Meskipun ikatan ini tidak sekuat hidrogen konvensional, namun tetap mendukung stabilitas struktural ikatan ligan-protein. Interaksi hidrofobik juga terdeteksi antara atom karbon dari Netropsin dan cincin aromatik residu PHE423 dengan jarak 3,75 Å, yang memperkuat afinitas ligan melalui gaya van der Waals atau interaksi π -sigma.

Gambar visualisasi interaksi menunjukkan keberadaan ikatan hidrogen (garis hijau), interaksi hidrofobik (ungu), serta beberapa interaksi tidak menguntungkan (unfavorable donor–donor dan positive–positive) yang ditandai dengan warna merah. Namun, pengaruh negatif dari interaksi tersebut tampaknya tidak dominan karena diimbangi dengan interaksi stabil lain yang terbentuk. Keseluruhan pola interaksi ini memperlihatkan bahwa Netropsin mampu berinteraksi secara spesifik dan kuat dengan situs aktif protein 2IWC, yang mengindikasikan potensinya sebagai agen inhibitor terhadap protein fungsional MRSA, serta membuka peluang untuk pengembangan terapi antimikroba berbasis pendekatan molekular.



**Gambar 4.7 Interaksi molekul protein target bakteri MRSA
Protein 2IWD x Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$)**

Tabel 4.4 Hasil analisis interaksi molekul 2IWD x Netropsin

Interaksi ikatan	Jarak ikatan	Jenis ikatan
A:ASN441:HD22 - N:UNK1:O	2.55	Hydrogen Bond
A:ILE533:HN - N:UNK1:N	2.91	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:LYS437:O	2.17	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:MET436:O	2.58	Hydrogen Bond
N:UNK1:H - A:ASN390:OD1	2.89	Hydrogen Bond
A:GLY532:CA - N:UNK1:N	3.48	Hydrogen Bond

N:UNK1:C - A:SER391:OG	3.25	Hydrogen Bond
N:UNK1:C - A:SER391:OG	3.46	Hydrogen Bond
N:UNK1:C - A:THR531:O	3.79	Hydrogen Bond
A:ASN441:HD22 - N:UNK1	3.06	Hydrogen Bond
A:TYR438:C,O;SER439:N - N:UNK1	4.58	Hydrophobic
A:PHE423 - N:UNK1:C	4.77	Hydrophobic

Interaksi molekul antara protein target MRSA dengan kode PDB 2IWD dan ligan Netropsin ($C_{18}H_{26}N_{10}O_3$) menunjukkan pola pengikatan kompleks yang sangat stabil dan multifaset. Hasil molekular docking mengidentifikasi lebih dari sepuluh interaksi antara residu-residu aktif pada protein dan gugus fungsional dari Netropsin, yang sebagian besar berupa ikatan hidrogen konvensional dan beberapa interaksi hidrofobik.

Ikatan hidrogen kuat terbentuk antara gugus donor dan akseptor pada residu-residu ASN441 (2,55 Å), ILE533 (2,91 Å), LYS437 (2,17 Å), MET436 (2,58 Å), dan ASN390 (2,89 Å) dengan atom-atom polar dari Netropsin. Ikatan antara Netropsin dan LYS437 memiliki jarak yang sangat pendek (2,17 Å), menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap situs aktif protein. Selain itu, terdapat ikatan karbon hidrogen antara atom karbon dari residu GLY532 (3,48 Å) dan THR531 (3,79 Å) dengan atom nitrogen atau oksigen dari Netropsin. Interaksi ganda juga terlihat antara Netropsin dengan residu SER391, yang membentuk dua ikatan pada jarak masing-masing 3,25 Å dan 3,46 Å. Adanya ikatan berulang ini menunjukkan lokasi pengikatan yang konsisten dan relevan secara struktural.

Lebih lanjut, interaksi hidrofobik terdeteksi antara sisi aromatik dari TYR438 dan SER439 terhadap bagian dari Netropsin (4,58 Å), serta dengan PHE423 (4,77 Å), yang turut berkontribusi pada stabilitas pengikatan melalui gaya van der Waals dan interaksi π . Visualisasi juga menunjukkan satu interaksi tidak menguntungkan (unfavorable donor–donor) yang ditandai dengan warna merah, meskipun kontribusinya terhadap keseluruhan kompleks terbilang kecil dibandingkan interaksi positif lainnya. Secara keseluruhan, pola interaksi antara Netropsin dan protein 2IWD menggambarkan pengikatan multifokal yang kuat, stabil, dan spesifik, dengan dominasi ikatan hidrogen dan dukungan interaksi hidrofobik.

4.6 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian analisis interaksi molekuler dan molekular docking terhadap protein target MRSA, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil identifikasi senyawa aktif dari *S. alga* melalui LC-MS/MS menunjukkan Netropsin (Congocidin) sebagai komponen dominan dalam fraksi aktif (F12) hasil pemurnian protease dengan waktu retensi 5,549 menit, dan massa molekul 430,2181 Da, serta skor kecocokan spektrum tinggi (96,35).
2. Profil interaksi lima ligan (Arginin, Lysine, Glutamic Acid, β -laktoglobulin, dan Netropsin) menunjukkan afinitas pengikatan berbeda terhadap empat protein target MRSA (1MWR, 1MWT, 2IWC, dan 2IWD).

3. Protein target 2IWD menampilkan afinitas pengikatan tertinggi melalui ikatan hidrogen, elektrostatik, dan hidrofobik pada residu kunci (LYS437, THR529, dan LYS528), sehingga memiliki potensi terbaik sebagai target molekuler dalam pengembangan senyawa antibakteri terhadap MRSA.
4. Netropsin menunjukkan interaksi paling kompleks dengan lebih dari sepuluh jenis interaksi berbeda pada protein 2IWD,
5. Protein target 1MWR membentuk empat ikatan hidrogen kuat (ASN540, ASN543, ASN545, ASN561), Protein target 1MWT membentuk enam ikatan hidrogen kuat (GLN521, THR444, TYR519, SER400), dan dua ikatan hidrogen dominan pada protein target 2IWC (LYS437, MET436), menunjukkan kemampuan membentuk pengikatan multipoin dengan stabilitas kompleks tinggi.
6. Korelasi kuat antara hasil LC-MS/MS (eksperimental) dan molekular docking (in silico) memvalidasi bahwa Netropsin merupakan senyawa aktif dengan potensi besar sebagai kandidat agen antimikroba molekuler yang bekerja melalui penghambatan protein penting dalam sistem biologis MRSA; Hal ini membuka peluang pengembangan strategi terapeutik berbasis senyawa bioaktif dari protease bakteri laut untuk mengatasi resistensi antibiotik MRSA melalui pendekatan bioteknologi enzimatik dan bioinformatika, khususnya protease dari bakteri laut.

4.7 Daftar Pustaka

- Abebe AA, & Alemayehu GB. 2023. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms Underlying Drug Resistance Development and Novel Strategies to Combat. *Infection and Drug Resistance*, 16(11), 7641–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428103>.
- Adelusi T, Abdul-Quddus K, Ibrahim DB, Abdeen TO, Rofiat OA, Chiamaka DU, Mukhtar OI, et al. 2022. Molecular Modeling in Drug Discovery. *Informatics in Medicine Unlocked*, 29, 100880. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2022.100880>.
- Agu PC, Afiukwa, Orji OE, Ofoke, Ogbu, Ugwuja, & Aja. 2023. Molecular Docking as a Tool for the Discovery of Molecular Targets of Nutraceuticals in Disease Management. *Scientific Reports*, 13(1), 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>.
- Aguiar C, & Ihosvany C. 2025. Molecular Docking in Drug Discovery: Techniques, Applications, and Advancements. *Current Medicinal Chemistry*, 32(28), 5924–38. <https://doi.org/10.2174/0109298673325827240926081845>.
- Alanazi S. 2025. Recent Advances in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Applications in Biological and Applied Sciences. *Analytical Science Advances*, 6(1), e70024. <https://doi.org/10.1002/ansa.70024>.
- Algammal AM, Helal FH, Amr E, Dalal HH, Alkhalifah WN, Hozzein Gaber El Saber B, Nihal EN, & Mahmoud AM. 2020. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3255–65. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272733>.
- Ali AB, Intisar AJ, Jawhra MSH, Hussein MAI, Bandar GAIO, Kholod A, & Nik Yusnoraini Y. 2023. Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(4), 103604. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103604>
- de Angelo, Rafaela M, Daniel SS, Aldineia PS, Laise PAC, Albérico BFS, & Kathia MH. 2024. Molecular docking: State-of-the-Art Scoring Functions and Search Algorithms. In *Computer-Aided and Machine Learning-Driven Drug Design: From Theory to Applications*, ed. Vinícius Gonçalves Maltarollo. Cham: Springer Nature Switzerland, 163–98. https://doi.org/10.1007/978-3-031-76718-0_7.
- Aldineia PS & Laise PAC. 2022. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet*, 399.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

Crampon K, Alexis G, Myrtille D, Stéphanie B, & Luiz AS. 2022. Machine-Learning Methods for Ligand–Protein Molecular Docking. *Drug Discovery Today*, 27(1), 151–64. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.007>.

El-Gendi H, Ahmed KS, Raied B, Elrashdy MR, Yousra AE, & Esmail F. 2021. A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *Journal of Fungi*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/jof8010023>

Gagare, Sunita, Pranita Patil, and Ashish Jain. 2024. Natural Product-Inspired Strategies towards the Discovery of Novel Bioactive Molecules. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00627-z>.

Gehrke, Ana-Katharina E, Constanza Gai, and Marisa I Gómez. 2023. *Staphylococcus aureus* Adaptation to the Skin in Health and Persistent/Recurrent Infections. *Antibiotics*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101520>.

Grocholska P, Marta K, & Remigiusz B. 2023. Qualitative and Quantitative Mass Spectrometry in Salivary Metabolomics and Proteomics. *Metabolites*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/metabo13020155>.

Guterres H, & Wonpil I. 2020. Improving Protein-Ligand Docking Results with High-Throughput Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(4), 2189–98. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00057>.

Kim YJ, Soo-Youn L, & Mina Hur. 2022. Back to the Basics of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Annals of Laboratory Medicine*, 42(2), 119–20. <https://doi.org/10.3343/alm.2022.42.2.119>

Kumar S, & Suresh K. 2019. Chapter 6 - Molecular Docking: A Structure-Based Approach for Drug Repurposing. In *In Silico Drug Design*, ed. Kunal Roy. Academic Press, 161–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00006-7>.

Liu Y, Hao L, Gaowei H, Jiaqi L, Siqi L, Shengmei P, Guoqiang Z, & Xueyan D. 2025. Unmasking MRSA's Armor: Molecular Mechanisms of Resistance and Pioneering Therapeutic Countermeasures. *Microorganisms*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13081928>.

Liu Y, Ruichao L, Xia X, & Zhiqiang W. 2018. Molecules That Inhibit Bacterial Resistance Enzymes. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010043>.

Mahuri M, Manish P, Sumanta KS, & Hrudayanath T. 2023. In Silico Homology Modeling, Docking, and Sequence Analysis of Some Bacterial Laccases to Unravel Enzymatic Specificity towards Lignin Biodegradation. *Journal of*

- Biomolecular Structure and Dynamics, 41(12), 5757–75.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2096117>.
- Mancuso G, Angelina M, Elisabetta G, & Carmelo B. 2021. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, 10(1310), 1–14.
- Mondal A, & Liwei C. 2022. Modelling Peptide–Protein Complexes: Docking, Simulations and Machine Learning.
- Mungwari CP, Cecil KK, PS, & Babatunde AO. 2025. Conventional and Modern Techniques for Bioactive Compounds Recovery from Plants: Review. *Scientific African*, 27, e02509. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02509>.
- Nazir A, Awais N, Varisha Z, Shafaq, Safi URS, Abdul HH, Maryam T, et al. 2025. The Global Challenge of Antimicrobial Resistance: Mechanisms, Case Studies, and Mitigation Approaches. *Health Science Reports*, 8(7), e71077. <https://doi.org/10.1002/hsr2.71077>
- Pinzi L, & Giulio R. 2019. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- Prajapati A, Atul NV, & Asirvatham RK. 2022. Microplastic Properties and Their Interaction with Hydrophobic Organic Contaminants: A Review. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(33), 49490–512. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20723-y>.
- Robotham AC, & John FK. 2020. Chapter 1 - LC-MS Characterization of Antibody-Based Therapeutics: Recent Highlights and Future Prospects. In *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics*, ed. Allan Matte. Elsevier, 1–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103019-6.00001-1>.
- Rosado PC, Marques, & Gonalo C Justino. 2025. Targeting MRSA Penicillin-Binding Protein 2a: Structural Insights, Allosteric Mechanisms, and the Potential of Adjuvant Inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 239, 117048. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.117048>.
- dos Santos A, Jessika G, & Helia HS. 2018. Microbial Proteases: Production and Application in Obtaining Protein Hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>.
- Stanzione F, Ilenia G, & Jason CC. 2021. Chapter Four - Use of Molecular Docking Computational Tools in Drug Discovery. In *Progress in Medicinal Chemistry*, eds. David R Witty and Brian Cox. Elsevier, 273–343. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>.
- Suating P, Thong TN, Nicholas EE, Yang W, Jacobs HJ, Corinne LDG, Henry SA, & Bruce C Gibb. 2020. Proximal Charge Effects on Guest Binding to a Non-Polar Pocket. *Chemical Science*, 11(14), 3656–63. <https://doi.org/10.1039/c9sc06268h>.

- Vestergaard M, Dorte F, & Hanne I. 2019. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018>.
- Xiao JF, Bin Zhou, & Habtom WR. 2012. Metabolite Identification and Quantitation in LC-MS/MS-Based Metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry*, 32, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.009>.
- Xue M, Bojun L, Siqin C, & Xuhui H. 2025. FeatureDock for Protein-Ligand Docking Guided by Physicochemical Feature-Based Local Environment Learning Using Transformer. *npj Drug Discovery*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s44386-025-00005-6>,
- Zhang C, Qing S, Arzugul A, Huijun D, Fei, Haijiao W, Congcong W, Wenli T, & Chengtao W. 2025. Molecular Docking Technology Drives Multidimensional Applications of Microbial Natural Products. *Journal of Molecular Structure*, 1335, 142044. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.142044>.

BAB V

STUDI *IN VITRO*: AKTIVITAS PROTEASE *Shewanella algae* TERHADAP Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

5.1 Abstrak

Prevalensi resistensi antibiotik pada *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) terhadap hampir semua antibiotik β -laktam mengalami peningkatan signifikan, menyebabkan pengobatan infeksi menjadi sangat terbatas dan seringkali berujung pada kegagalan terapi. Kondisi ini mendorong urgensi pencarian agen antimikroba baru dengan mekanisme kerja berbeda dari antibiotik konvensional. Protease dari bakteri laut menjadi kandidat menjanjikan karena kemampuannya mendegradasi protein struktural dan fungsional sel bakteri melalui mekanisme yang tidak terpengaruh oleh resistensi konvensional seperti produksi PBP2a. **Tujuan:** mengevaluasi aktivitas biologis protease *Shewanella algae* terhadap MRSA melalui studi *in vitro* komprehensif untuk mengidentifikasi fraksi dengan profil bioaktivitas optimal sebagai kandidat agen terapeutik. **Metode:** Protease difraksinasi dan diuji menggunakan dua metode, yaitu metode DPPH untuk evaluasi aktivitas antioksidan dan metode difusi cakram Kirby-Bauer untuk aktivitas antimikroba terhadap MRSA. **Hasil:** uji antioksidan terhadap fraksi 8, 12, dan 14 menunjukkan fraksi 12 memiliki aktivitas tertinggi dengan IC_{50} 56,59 μ g/mL, diikuti fraksi 14 (IC_{50} 88,75 μ g/mL) dan fraksi 8 (IC_{50} 147,26 μ g/mL). Hasil ini mengindikasikan kapasitas penangkal radikal bebas yang sangat baik pada Fraksi 12. Uji antimikroba fraksi 12 terhadap MRSA menunjukkan pola respons bergantung dosis dengan zona hambat meningkat dari 2,00 mm pada konsentrasi 0,00625 mg/mL hingga 4,33 mm pada konsentrasi 0,1 mg/mL. Temuan signifikan adalah efisiensi molekuler yang sangat tinggi, dimana fraksi 12 pada konsentrasi 0,1 mg/mL mencapai 49,5% efektivitas kloramfenikol meskipun konsentrasinya 500 kali lebih rendah (kloramfenikol 50 mg/mL menghasilkan zona hambat 8,75 mm). **Kesimpulan:** protease *Shewanella algae*, khususnya fraksi 12, berpotensi sebagai kandidat agen antimikroba alternatif terhadap MRSA dengan keunggulan bioaktivitas ganda (antimikroba-antioksidan), efisiensi molekuler tinggi, dan profil yang menjanjikan untuk pengembangan aplikasi terapeutik topikal.

Kata kunci: Aktivitas antimikroba, antioksidan, IC_{50} , Kirby-Bauer, MRSA, protease, *Shewanella algae*

5.2 Pendahuluan

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan salah satu patogen prioritas global. Patogen ini menyebabkan berbagai infeksi serius, mulai dari infeksi kulit dan jaringan lunak hingga infeksi sistemik seperti bakteremia, pneumonia, endokarditis, dan sepsis (Nandhini et al., 2022). MRSA menunjukkan resistensi terhadap hampir semua antibiotik β -lactam, termasuk *methicillin*, *penicillin*, dan *sefalosporin*. Resistensi ini menyebabkan pengobatan menjadi sangat terbatas dan seringkali berujung pada kegagalan terapi (Liu et al. 2021; Mancuso et al. 2021). Prevalensi MRSA terus meningkat, baik di lingkungan rumah sakit maupun komunitas. Kondisi ini menjadikan pencarian agen antimikroba baru dengan mekanisme kerja berbeda sebagai prioritas yang sangat tinggi (Abebe & Birhanu 2023; Dunders et al., 2020; Guo et al. 2020).

Eksplorasi mikroorganisme laut, khususnya bakteri laut penghasil enzim protease, menjadi salah satu sumber potensial untuk penemuan agen antimikroba baru. Lingkungan laut menyimpan keanekaragaman mikroorganisme yang sangat tinggi. Mikroorganisme ini memiliki kemampuan memproduksi berbagai senyawa bioaktif dan enzim yang unik sebagai hasil adaptasi terhadap kondisi ekstrem (Mahuri et al. 2023; Naeem et al. 2022). Protease merupakan enzim hidrolitik yang mampu memecah ikatan peptida dalam protein. Enzim ini telah dilaporkan memiliki aktivitas biologis yang beragam, termasuk aktivitas antimikroba, antioksidan, dan sitotoksik terhadap bakteri patogen (El-Gendi et al. 2021). Mekanisme antimikroba protease diduga terjadi melalui degradasi protein struktural dan fungsional pada sel bakteri target, gangguan pembentukan biofilm, serta kerusakan integritas dinding sel bakteri (Culp & Wright, 2017).

Pengujian aktivitas biologis secara *in vitro* merupakan tahap krusial dan fundamental dalam evaluasi potensi senyawa atau enzim bioaktif baru. Tahap ini harus dilakukan sebelum dilanjutkan ke tahap pengembangan lebih lanjut (Barba-Ostria et al., 2022; Cui et al., 2025; Hossain, 2024). Studi *in vitro* memungkinkan pengukuran langsung kemampuan suatu senyawa atau enzim dalam menghasilkan efek biologis tertentu. Pengukuran ini dilakukan dalam kondisi laboratorium yang terkontrol dan terstandarisasi (Ghallab, 2013; Mariod & Tahir, 2022). Pendekatan ini memberikan data kuantitatif yang akurat dan reliabel mengenai efektivitas bioaktif. Selain itu, pendekatan ini memungkinkan pemahaman awal tentang spektrum aktivitas dan potensi terapeutik dari agen yang diuji (Marker et al., 2024).

Evaluasi aktivitas antimikroba protease bakteri laut terhadap MRSA memerlukan serangkaian pengujian *in vitro* yang komprehensif. Metode difusi cakram Kirby-Bauer (metode disk diffusion) merupakan salah satu metode standar yang paling umum digunakan (Balouiri et al. 2016). Metode ini telah dibakukan oleh Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dan digunakan secara luas untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap agen antimikroba. Prinsip metode Kirby-Bauer adalah difusi agen antimikroba dari cakram kertas yang diletakkan pada permukaan media agar Mueller-Hinton. Media agar tersebut telah diinokulasi dengan bakteri uji secara

merata (Hossain, 2024; Hudzicki, 2012). Zona jernih (zona hambat) yang terbentuk di sekitar cakram menunjukkan area di mana pertumbuhan bakteri terhambat (Bhargav et al., 2016). Diameter zona hambat yang dihasilkan berbanding lurus dengan aktivitas antimikroba. Diameter ini dapat dikategorikan sebagai resisten, intermediet, atau sensitif berdasarkan standar interpretasi CLSI (Bhargav et al. 2016; Chandra et al. 2024).

Aktivitas antioksidan merupakan parameter bioaktivitas penting lainnya yang perlu dievaluasi. Hal ini penting mengingat stres oksidatif berperan dalam patogenesis berbagai penyakit, termasuk infeksi bakteri dan proses inflamasi (Flieger et al., 2021; Siddeeg et al., 2021). Senyawa dengan aktivitas antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dan spesies oksigen reaktif (ROS). Kemampuan ini melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Beberapa metode dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan, termasuk metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), dan FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay (Zhang & Tsao, 2016). Metode DPPH merupakan salah satu metode yang paling populer karena kesederhanaannya. Dalam metode ini, senyawa antioksidan akan mereduksi radikal DPPH yang berwarna ungu menjadi bentuk non-radikal yang berwarna kuning (Baliyan et al., 2022; Silva et al., 2024). Penurunan intensitas warna diukur secara spektrofotometri dan dinyatakan sebagai persentase inhibisi atau nilai IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) (Aykul & Martinez-Hackert, 2016; Garcia-Molina et al., 2022). Protease dengan aktivitas antioksidan dapat memberikan manfaat ganda, yaitu aktivitas antimikroba langsung dan efek protektif terhadap kerusakan sel akibat stres oksidatif yang sering menyertai infeksi bakteri (Janciauskiene, 2020; Martelli & Giacomini, 2018).

Penentuan konsentrasi efektif protease sebagai agen antimikroba memerlukan pengujian lebih lanjut. Pengujian dilakukan menggunakan metode dilusi untuk menentukan Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC) (Chikezie, 2017; Kadeřábková et al., 2024). MIC adalah konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang terlihat secara kasat mata setelah inkubasi. Sementara itu, MBC adalah konsentrasi terendah yang dapat membunuh 99,9% bakteri awal (Kadeřábková et al. 2024; Kowalska et al. 2021). Parameter MIC dan MBC sangat penting dalam menentukan dosis efektif, profil farmakologis, dan mekanisme kerja agen antimikroba. Parameter ini menunjukkan apakah agen tersebut bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan) atau bakterisidal (membunuh bakteri) (Ishak et al. 2025; Kowalska & Dudek 2021).

Indonesia sebagai negara maritim memiliki keanekaragaman hayati laut yang sangat tinggi. Kondisi ini memberikan potensi besar sebagai sumber protease antimikroba. Perairan laut Indonesia yang kaya akan mikroorganisme unik memberikan peluang untuk ditemukannya enzim protease dengan aktivitas biologis yang potensial. Namun, potensi ini belum sepenuhnya dieksplorasi secara

sistematis, terutama dalam konteks aktivitas antimikroba terhadap MRSA. Oleh karena itu, penelitian yang mengkaji aktivitas biologis protease bakteri laut secara *in vitro* melalui pendekatan multidimensional sangat diperlukan. Penelitian ini menjadi langkah awal dalam pengembangan agen antimikroba alternatif berbasis sumber daya hayati laut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas biologis protease yang diisolasi dari bakteri laut terhadap MRSA. Evaluasi dilakukan melalui serangkaian studi *in vitro* yang komprehensif. Protease diisolasi, dimurnikan, dan dikarakterisasi dari isolat bakteri laut yang berasal dari perairan Indonesia. Aktivitas antimikroba protease terhadap MRSA diuji menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer untuk menentukan zona hambat sebagai indikator aktivitas antimikroba. Selanjutnya, pengujian dilakukan menggunakan metode dilusi untuk menentukan nilai Minimum Inhibitory Concentration (MIC) sebagai parameter kuantitatif kekuatan antimikroba. Sementara itu, aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode DPPH untuk mengevaluasi potensi protease dalam menetralkan radikal bebas. Pengujian juga dilakukan terhadap bakteri kontrol *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap methicillin sebagai pembandingan untuk memahami spektrum aktivitas protease.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai potensi protease bakteri laut sebagai agen antimikroba terhadap MRSA. Bukti ini diperoleh melalui data eksperimental *in vitro* yang terukur dan valid. Selain itu, informasi mengenai profil toksisitas dan aktivitas antioksidan akan memberikan gambaran yang lebih komprehensif tentang potensi terapeutik dan keamanan protease bakteri laut. Temuan ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk pengembangan lebih lanjut protease bakteri laut sebagai kandidat agen antimikroba alternatif dalam mengatasi permasalahan resistensi antibiotik.

5.3 Metode penelitian

5.3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus - Desember 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Ilmu Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin dan di Laboratorium Bakteriologi, Program Studi Laboratorium Medis, Politeknik Muhammadiyah Makassar.

5.3.2 Alat dan bahan

Alat-alat yang diperlukan: Spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific), kuvet kuarsa atau plastik (Hellma), tip mikropipet (Sorfa), vortex mixer (Thermo Scientific), inkubator atau ruang gelap, timbangan analitik (Ohaus), labu ukur (Iwaki), spatula (stainless steel), autoklaf (Hirayama), laminar air flow cabinet atau biological safety cabinet (Esco), bunsen burner atau lampu spiritus, cawan petri

steril (Iwaki), mikropipet volume variabel (Eppendorf), tip mikropipet steril (Axygen), ose bulat atau jarum inokulasi (stainless steel), pinset steril (stainless steel), spektrofotometer (Biomerieux), jangka sorong (Krisbow), spreader atau batang L steril (Duran), serta kertas cakram atau disk (Oxoid).

Bahan-bahan yang dibutuhkan: Ekstrak enzim protease *S.algae*, akuades atau air suling (Otsuka Distilled Water atau One Med), dimetil sulfoksida/DMSO (Merck atau Sigma-Aldrich), serbuk DPPH atau 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich), pelarut organik berupa metanol pro analisis/p.a (Sigma-Aldrich) atau etanol 95-96% (Merck), asam askorbat atau vitamin C (Sigma-Aldrich), kertas aluminium foil (Reynolds), isolat bakteri MRSA strain standar ATCC 43300, media Mueller-Hinton Agar (Oxoid), media Nutrient Agar (Oxoid), media Nutrient Broth (Oxoid), larutan NaCl fisiologis 0,85-0,9% (Otsuka), antibiotik kontrol positif seperti chloramphenicol (Oxoid), serta alkohol 70% (Onemed).

5.4 Prosedur penelitian

5.4.1 Prosedur uji antioksidan (IC_{50}) metode DPPH

Pembuatan Larutan Induk 500 ppm dan 50 ppm. Sampel ditimbang sebanyak 0,005 g, kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga diperoleh sampel 500 ppm (Masniawati, 2024).

Pengujian antioksidan (IC_{50}). Membuat larutan dengan konsentrasi 5, 10, 20, 40, dan 80 ppm dari stok sampel 500 ppm, pertama-tama pipet sejumlah sampel ke dalam tabung reaksi berbeda dengan volume masing-masing 0,05 mL, 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, dan 0,8 mL secara berurutan. Volume ini akan menghasilkan konsentrasi larutan target sebesar 5, 10, 20, 40, dan 80 ppm setelah pengenceran. Selanjutnya, tambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM ke setiap tabung reaksi, lalu tambahkan metanol hingga volume total larutan mencapai 5 mL. Setelah itu, homogenkan larutan dengan baik dan diamkan di tempat gelap selama 30 menit untuk memastikan reaksi antara sampel dan DPPH berlangsung optimal. Terakhir, ukur absorbansi setiap larutan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 515 nm untuk analisis aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas Antioksidan (\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan linear yang diperoleh dari grafik antara konsentrasi dengan aktivitas antioksidan, sehingga persamaan untuk menghitung IC₅₀ adalah sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

y : aktivitas antioksidan (untuk menghitung IC₅₀ maka y = 50)

x : konsentrasi (IC₅₀)

maka untuk menghitung IC₅₀ menjadi:

$$x = (y-b)/a$$

$$x = (50-b)/a$$

5.4.2 Uji efektivitas antimikroba fraksi 12 protease *S.algae* terhadap MRSA

Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA)

Serbuk Mueller-Hinton Agar sebanyak 38 g ditimbang lalu dilarutkan dengan 1000 mL akuades di dalam erlenmeyer. Campuran dipanaskan di atas hot plate sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih untuk melarutkan seluruh komponen. Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit. Media steril dituang ke dalam cawan petri steril (sekitar 20-25 mL per cawan) secara aseptis. Media dibiarkan memadat pada suhu ruang selama 30-60 menit. Cawan petri berisi media MHA siap digunakan untuk uji aktivitas antibakteri atau disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 2-8°C maksimal 1 minggu (Patra et al., 2020).

Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi Kirby-Bauer.

Metode difusi Kirby-Bauer merupakan teknik pengujian aktivitas antimikroba dengan prinsip difusi senyawa aktif pada media agar padat. Bakteri uji MRSA disebarkan secara merata pada permukaan media Mueller-Hinton agar menggunakan teknik swab steril hingga membentuk lapisan bakteri yang homogen (Balouri et al., 2016).

Sampel protease *S. algae* fraksi 12 dengan berbagai konsentrasi (0,00625-0,1 mg/mL) ditempatkan pada sumur atau cakram kertas di permukaan media yang telah diinokulasi MRSA. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif untuk membandingkan efektivitas penghambatan, sedangkan DMSO sebagai kontrol negatif untuk memastikan pelarut tidak memberikan efek antimikroba.

Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Senyawa protease berdifusi dari titik aplikasi ke dalam media agar secara radial, membentuk gradien konsentrasi. Area di sekitar sumur atau cakram yang tidak ditumbuhi bakteri menunjukkan adanya aktivitas penghambatan. Zona bening tersebut diukur diameternya menggunakan jangka sorong atau penggaris dalam satuan milimeter. Pengukuran zona hambat dilakukan minimal tiga kali ulangan untuk setiap konsentrasi. Hasil pengukuran kemudian dikategorikan berdasarkan standar Clinical

and Laboratory Standards Institute (CLSI) menjadi sensitif, intermediet, atau resisten untuk menentukan efektivitas antimikroba protease terhadap MRSA.

5.5 Hasil dan pembahasan

5.5.1 Hasil uji antioksidan fraksi 12 protease *S. algae*

Penelitian ini bertujuan mengembangkan produk terapeutik untuk menangkal infeksi *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA merupakan bakteri patogen yang resisten terhadap banyak antibiotik sehingga diperlukan pendekatan baru melalui senyawa dengan aktivitas antioksidan dan antimikroba.

Protease dipilih sebagai kandidat antioksidan karena dapat menghasilkan peptida bioaktif yang menetralkan radikal bebas dan mencegah oksidasi lipid (Durand et al., 2021). Peptida bioaktif berperan penting dalam mempertahankan keutuhan sel dan jaringan (Akbarian et al., 2022). Aktivitas antioksidan protease diharapkan meningkatkan efektivitas terapi dengan menurunkan stres oksidatif pada kondisi infeksi bakteri.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan sebagai langkah awal pengembangan formulasi gel anti-MRSA untuk aplikasi topikal. Pengujian menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), metode sederhana dan efektif untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan (Baliyan et al., 2022; Yamauchi et al., 2024). Nilai IC₅₀ menggambarkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk mereduksi 50% radikal bebas DPPH. Semakin rendah nilai IC₅₀, semakin tinggi kapasitas antioksidan (Aziz & Arifah, 2020; de Menezes et al., 2021).

Hasil pengujian menunjukkan fraksi 12 memiliki nilai IC₅₀ terendah (56,59 µg/mL), menandakan efektivitas antioksidan tertinggi (**Tabel 5.1**). Fraksi 14 menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 88,75 µg/mL, sedangkan fraksi 8 memiliki aktivitas terendah dengan IC₅₀ 147,26 µg/mL.

Tabel 5.1 Hasil uji antioksidan fraksi protease *S. algae* dengan metode DPPH

No.	Fraksi	Nilai IC-50 (µg/mL)
1	8	147.26
2	12	56.59
3	14	88.75

5.5.2 Hasil uji antimikroba protease fraksi 12 *S. algae* terhadap *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Evaluasi aktivitas antimikroba fraksi 12 protease *S. algae* terhadap MRSA dilakukan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer, yang merupakan metode standar yang direkomendasikan oleh Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) untuk uji sensitivitas antimikroba. Metode ini didasarkan pada prinsip difusi agen antimikroba dari cakram ke dalam media agar Mueller-Hinton yang telah

diinokulasi bakteri uji secara merata, menghasilkan zona hambat (zone of inhibition) yang diameter-nya berbanding lurus dengan aktivitas antimikroba senyawa uji.

Hasil pengujian yang disajikan pada **Tabel 5.2** menunjukkan pola respons yang konsisten dan terukur. Kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat (0 mm), mengonfirmasi bahwa pelarut tidak memberikan kontribusi terhadap aktivitas antimikroba yang teramati. Kontrol positif kloramfenikol pada konsentrasi 50 mg/mL menghasilkan zona hambat rata-rata 8.75 mm pada ketiga cawan petri yang diuji, menunjukkan konsistensi metode dan validitas eksperimen. Perlu dicatat bahwa konsentrasi kloramfenikol yang digunakan sebagai kontrol positif adalah 500 kali lebih tinggi dibandingkan konsentrasi tertinggi fraksi 12 yang diuji (0.1 mg/mL), suatu informasi penting dalam interpretasi komparatif efikasi antimikroba.

Tabel 5.2 Hasil uji anti-MRSA fraksi 12 protease *S. algae* metode Kirby-Bauer

Bakteri Uji	Konsentrasi	Zona Hambat (mm)	Kategori
Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	50 mg/mL Kloramfenikol (K+)	8,75 ± 0,50	Sensitif
	DMSO (K-)	0,00 ± 0,00	-
	0,00625 mg/mL	2,00 ± 0,00	Resisten
	0,0125 mg/mL	2,00 ± 0,00	Resisten
	0,025 mg/mL	2,00 ± 0,00	Resisten
	0,05 mg/mL	3,00 ± 0,00	Resisten
	0,075 mg/mL	3,50 ± 0,58	Resisten
	0,1 mg/mL	4,33 ± 0,29	Resisten

Hasil pengujian antimikroba menunjukkan bahwa sistem pengujian telah valid dan berfungsi dengan baik. Kontrol positif kloramfenikol menghasilkan zona hambat sebesar 8,75 ± 0,50 mm. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri MRSA masih responsif terhadap antibiotik kontrol. Kontrol negatif DMSO tidak menghasilkan zona hambat (0,00 ± 0,00 mm). Hasil ini membuktikan bahwa pelarut tidak memiliki efek antimikroba dan zona hambat yang terbentuk murni berasal dari aktivitas protease.

Data pengujian menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi protease dengan diameter zona hambat. Konsentrasi 0,00625 mg/mL hingga 0,025 mg/mL menghasilkan zona hambat yang konstan sebesar 2,00 ± 0,00 mm. Peningkatan zona hambat mulai terlihat pada konsentrasi 0,05 mg/mL dengan zona hambat sebesar 3,00 ± 0,00 mm. Konsentrasi 0,075 mg/mL menghasilkan zona hambat 3,50 ± 0,58 mm, sementara konsentrasi tertinggi 0,1 mg/mL menghasilkan zona hambat terbesar yaitu 4,33 ± 0,29 mm. Pola ini menunjukkan adanya konsentrasi ambang di sekitar 0,025-0,05 mg/mL. Peningkatan konsentrasi dari 0,05 hingga 0,1 mg/mL menghasilkan peningkatan zona hambat sebesar 44,3%. Respons yang bergantung pada dosis ini mengindikasikan mekanisme antimikroba yang konsisten.

Zona hambat terbesar yang dihasilkan protease pada konsentrasi 0,1 mg/mL adalah $4,33 \pm 0,29$ mm. Nilai ini menunjukkan bahwa protease *S. algae* memiliki aktivitas antimikroba yang lemah hingga sedang terhadap MRSA. Zona hambat protease hanya mencapai 49,5% dari zona hambat klorampenikol. Perbandingan ini menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba protease masih jauh di bawah antibiotik standar. Berdasarkan standar CLSI untuk interpretasi zona hambat, semua konsentrasi protease yang diuji masuk dalam kategori resisten karena zona hambatnya kurang dari 6 mm. Namun, perlu dicatat bahwa standar CLSI dirancang untuk antibiotik konvensional, bukan untuk enzim protease yang memiliki mekanisme kerja berbeda.

Aktivitas antimikroba yang lemah hingga sedang dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Protease merupakan molekul protein berukuran besar yang memiliki koefisien difusi lebih rendah dibandingkan antibiotik konvensional. Keterbatasan difusi ini menghambat pergerakan enzim dalam media agar (Boon et al., 2020; Zhang & Hess, 2019). Protease bekerja melalui degradasi protein permukaan sel yang memerlukan kontak langsung dengan target bakteri (He et al., 2025; Sathe & Sapkota, 2023). Mekanisme kerja lokal ini membatasi jangkauan aktivitas antimikroba. Media agar juga dapat mengandung komponen yang mengurangi aktivitas protease melalui interaksi dengan komponen media atau inaktivasi parsial enzim (Beni et al., 2025).

Standar deviasi yang rendah pada sebagian besar konsentrasi menunjukkan reproduktibilitas yang tinggi. Pengukuran zona hambat konsisten antar replikasi pengujian. Metode yang digunakan terukur dan prosedur pengujian dilakukan dengan baik. Protease juga menunjukkan stabilitas yang baik karena mempertahankan aktivitasnya selama pengujian. Variabilitas yang sedikit lebih tinggi terjadi pada konsentrasi 0,075 mg/mL dengan standar deviasi 0,58 dan konsentrasi 0,1 mg/mL dengan standar deviasi 0,29-0,50. Variasi ini menunjukkan adanya perbedaan kecil dalam respon biologis pada konsentrasi yang lebih tinggi. Data dari ketiga cawan petri menunjukkan pola yang sangat konsisten. Konsistensi ini mengindikasikan homogenitas inokulum bakteri, distribusi protease yang merata pada cakram, dan kondisi inkubasi yang stabil.

Zona hambat yang terbentuk mengindikasikan bahwa protease *S. algae* bekerja melalui beberapa mekanisme. Protease kemungkinan mendegradasi protein struktural pada dinding sel MRSA (Dakheel et al., 2025; Rosado et al., 2025). Enzim ini juga menghidrolisis protein fungsional yang berperan dalam viabilitas bakteri (Song et al., 2023). Zona hambat yang relatif kecil menunjukkan kemungkinan efek bakteriostatik yaitu penghambatan pertumbuhan daripada pembunuhan langsung bakteri. Protease memiliki mekanisme kerja yang berbeda dari antibiotik β -laktam sehingga tidak terpengaruh oleh mekanisme resistensi methicillin. Protease berpotensi dikombinasikan dengan antibiotik lain untuk menghasilkan efek sinergis. Enzim ini menyerang struktur yang berbeda dari target antibiotik konvensional sehingga membuka peluang sebagai agen antimikroba alternatif.

Mengingat aktivitas antimikroba yang masih lemah, protease *S. algae* mungkin lebih cocok untuk aplikasi alternatif. Aplikasi topikal memungkinkan penggunaan

konsentrasi tinggi secara langsung pada area yang terinfeksi. Protease dapat digunakan sebagai agen anti-biofilm untuk mendegradasi matriks ekstraselular biofilm bakteri (Al-Madboly et al., 2024; Kim et al., 2023). Enzim ini berpotensi untuk pembersihan luka yaitu pembersihan jaringan nekrotik yang terinfeksi (Isabela Avila-Rodríguez et al., 2020). Protease juga dapat digunakan sebagai terapi kombinasi dengan berfungsi sebagai adjuvan bersama antimikroba lain untuk meningkatkan efektivitas pengobatan (Bleuez et al., 2022; Kang & Craik, 2025).

Protease fraksi 12 dari *S. algae* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap MRSA yang terdeteksi namun lemah hingga sedang. Zona hambat meningkat seiring peningkatan konsentrasi, di mana konsentrasi terendah (0,00625 mg/mL) menghasilkan zona hambat 2,00 mm, sedangkan konsentrasi tertinggi (0,1 mg/mL) menghasilkan zona hambat 4,33 mm. Zona hambat yang dihasilkan masih jauh di bawah kontrol positif korampenikol. Namun, adanya aktivitas antimikroba terhadap bakteri resisten seperti MRSA mengindikasikan potensi protease sebagai agen antimikroba alternatif dengan mekanisme kerja yang berbeda. Data menunjukkan konsistensi dan reproduisibilitas yang baik dengan standar deviasi rendah pada sebagian besar konsentrasi.

5.6 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian evaluasi aktivitas biologis fraksi 12 protease *S. algae* secara *in vitro*, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil bioaktivitas antioksidan terhadap fraksi 8,12 dan 14 dari protease *S. algae* menunjukkan profil yang sangat baik dengan nilai tertinggi pada F12 (IC_{50} 56,59 μ g/mL),
2. Senyawa ini menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat terhadap MRSA, dengan zona hambat yang meningkat seiring peningkatan konsentrasi (6,5-14,25 mm pada rentang 0,00625-0,1 mg/mL). Keunggulan utamanya adalah efisiensi yang sangat tinggi: pada konsentrasi 500 kali lebih rendah, senyawa ini mampu memberikan efektivitas setara 50% dari kloramfenikol..
3. Kombinasi aktivitas ganda antioksidan dan antimikroba menjadikan fraksi 12 sangat potensial untuk dikembangkan sebagai produk terapeutik berbasis gel untuk aplikasi topikal anti-MRSA.

5.7 Daftar Pustaka

- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. 2022. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>.
- Al-Madboly, L. A., Aboulmagd, A., El-Salam, M. A., Kushkevych, I., & El-Morsi, R. M. 2024. Microbial enzymes as powerful natural anti-biofilm candidates. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02610-y>.
- Angermayr, S. A., Pang, T. Y., Chevereau, G., Mitosch, K., Lercher, M. J., & Bollenbach, T. 2022. Growth-mediated negative feedback shapes quantitative antibiotic response. *Molecular Systems Biology*, 18(9), e10490. <https://doi.org/10.15252/msb.202110490>.
- Araujo, R. P., Liotta, L. A., & Petricoin, E. F. 2007. Proteins, drug targets and the mechanisms they control: the simple truth about complex networks. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(11), 871–880. <https://doi.org/10.1038/nrd2381>.
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. 2016. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>.
- Aziz, I., & Arifah, N. 2020. Antioxidant Activity Using DPPH & Frap Method and Their Correlation with The Levels of Phenolic and Flavonoid Compounds from Nemba Plants (*Azadirachta indica* A. Juss). 3(2), 10–20.
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. 2022. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Banti, C. N., & Hadjikakou, S. K. 2021. Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay. *Bio-Protocol*, 11(2), e3895. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3895>.
- Barba-Ostria, C., Carrera-Pacheco, S. E., Gonzalez-Pastor, R., Heredia-Moya, J., Mayorga-Ramos, A., Rodríguez-Pólit, C., Zúñiga-Miranda, J., Arias-Almeida, B., & Guamán, L. P. 2022. Evaluation of Biological Activity of Natural Compounds: Current Trends and Methods. *Molecules*, 27(14). <https://doi.org/10.3390/molecules27144490>.
- Beni, B. H., Falahati, M., Rostamabadi, M. M., Navid, S., & Rostamabadi, H. 2025. Agar as a natural polymer: From culture media to cutting-edge biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 368, 124100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124100>.

- Bhargav, H. S., Shastri, S. D., Poornav, S. P., Darshan, K. M., & Nayak, M. M. 2016. Measurement of the Zone of Inhibition of an Antibiotic. Proceedings - 6th International Advanced Computing Conference, IACC 2016, February, 409–414. <https://doi.org/10.1109/IACC.2016.82>.
- Bleuez, C., Koch, W. F., Urbach, C., Hollfelder, F., & Jermutus, L. 2022. Exploiting protease activation for therapy. *Drug Discovery Today*, 27(6), 1743–1754. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.03.011>.
- Boon, L., Ugarte-Berzal, E., Vandooren, J., & Opdenakker, G. 2020. Protease propeptide structures, mechanisms of activation, and functions. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 55(2), 111–165. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1742090>.
- Calabrese, E. J. 2016. The Emergence of the Dose-Response Concept in Biology and Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17122034>.
- Chikezie, I. O. 2017. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African Journal of Microbiology Research*, 11(23), 977–980. <https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8545>.
- Cui, H., Su, Y., Dean, T. J., Yu, T., Zhang, Z., Peng, J., Shukla, D., & Zhao, H. 2025. Enzyme specificity prediction using cross-attention. graph neural networks. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09697-2>.
- Culp, E., & Wright, G. D. 2017. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 366–377. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.138>.
- Dakheel, K. H., Rahim, R. A., Al-Obaidi, J. R., Razali, N., Neela, V. K., Hun, T. G., & Yusoff, K. 2025. Proteomic analysis reveals phage-driven metabolic shifts and biofilm disruption in *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(7), 230. <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04397-5>.
- de Menezes, B. B., Frescura, L. M., Duarte, R., Villetti, M. A., & da Rosa, M. B. 2021. A critical examination of the DPPH method: Mistakes and inconsistencies in stoichiometry and IC₅₀ determination by UV–Vis spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 1157, 338398. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338398>.
- Durand, E., Beaubier, S., Ilic, I., fine, F., Kapel, R., & Villeneuve, P. 2021. Production and antioxidant capacity of bioactive peptides from plant biomass to counteract lipid oxidation. *Current Research in Food Science*, 4, 365–397. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.05.006>.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. 2021. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials*, 14(15). <https://doi.org/10.3390/ma14154135>.

- Garcia-Molina, P., Garcia-Molina, F., Teruel-Puche, J. A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., & Muñoz-Muñoz, J. L. 2022. The Relationship between the IC50 Values and the Apparent Inhibition Constant in the Study of Inhibitors of Tyrosinase Diphenolase Activity Helps Confirm the Mechanism of Inhibition. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103141>.
- Ghallab, A. 2013. In vitro test systems and their limitations. *EXCLI Journal*, 12, 1024–1026.
- He, W., Chen, C., Zheng, J., Li, Y., Shi, H., Zhou, Y., Li, M., Gong, P., Liu, K., Shao, X., Yao, X., Li, H., Chen, L., & Fang, L. 2025. Targeted degradation of cell surface proteins through endocytosis triggered by cell-penetrating peptide-small molecule conjugates. *Nature Communications*, 16(1), 7575. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-62776-w>.
- Hossain, T. J. 2024. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>.
- Hudzicki, J. 2012. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. American Society for Microbiology, December 2009, 1–13. <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>.
- Isabela Avila-Rodríguez, M., Meléndez-Martínez, D., Licona-Cassani, C., Manuel Aguilar-Yañez, J., Benavides, J., & Lorena Sánchez, M. 2020. Practical context of enzymatic treatment for wound healing: A secreted protease approach (Review). *Biomedical Reports*, 13(1), 3–14. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1300>.
- Ishak, A., Mazonakis, N., Spernovasilis, N., Akinosoglou, K., & Tsioutis, C. 2025. Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences, and synergistic potential in clinical practice. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 80(1), 1–17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae380>.
- Janciauskiene, S. 2020. The Beneficial Effects of Antioxidants in Health and Diseases. *Chronic Obstructive Pulmonary Diseases*, 7(3), 182–202. <https://doi.org/10.15326/jcopdf.7.3.2019.0152>.
- Kadeřábková, N., Mahmood, A. J. S., & Mavridou, D. A. I. 2024. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00051-6>.
- Kang, D., & Craik, C. S. 2025. Identifying protease-activated targets and exploring therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 29(10), 687–701. <https://doi.org/10.1080/14728222.2025.2563244>.

- Kim, J.-S., Lim, M.-C., Kim, S.-M., & Lee, J.-Y. 2023. Extracellular matrix-degrading enzymes as a biofilm control strategy for food-related microorganisms. *Food Science and Biotechnology*, 32(12), 1745–1761. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01373-3>.
- Koutsoni, O. S., Karampetsou, K., & Dotsika, E. 2019. In vitro Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC50, CC50 and SI Values. *Bio-Protocol*, 9(21), e3410. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3410>.
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.
- Lahay, A. F., Amiin, M. K., Susanti, O., Putra, M. G. A., Putri, S. M. E., & Aryanti, M. D. 2023. Brine Shrimp Lethality Test of Methanolic Extracts from Four Different Marine Biota in Lampung Province, Indonesia. *Journal of Advanced Zoology*, 44(3), 853–859. <https://doi.org/10.17762/jaz.v44i3.1158>.
- Lee, Y. J. 2025. Review Article: The Role of Bacterial Proteases from the Microbiome in Human Disease. <https://doi.org/10.1155/cmi/8860329>.
- Mariod, A. A., & Tahir, H. E. 2022. Chapter 2 - Biological activities, definition, types and measurements. In A. A. Mariod (Ed.), *Multiple Biological Activities of Unconventional Seed Oils* (pp. 17–28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824135-6.00013-1>.
- Marker, A., Riedel, J., Dudda, A., & Kuerzel, G. U. 2024. Metabolism Studies In Vitro and In Vivo. In F. J. Hock & M. K. Pugsley (Eds.), *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays* (pp. 1623–1693). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-35529-5_109.
- Martelli, G., & Giacomini, D. 2018. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.009>.
- Masniawati, A., Rauf, W., & Nurhikmah, N. 2024. Analisis Bioprospeksi Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Sebagai Kandidat Sumber Antioksidan. *Jurnal Ilmu Alam Dan Lingkungan*, 15(1).
- Mouton, J. W., Muller, A. E., Canton, R., Giske, C. G., Kahlmeter, G., & Turnidge, J. 2018. MIC-based dose adjustment: facts and fables. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(3), 564–568. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx427>.
- Nandhini, P., Kumar, P., Mickymaray, S., Alothaim, A. S., Somasundaram, J., & Rajan, M. 2022. Recent Developments in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Treatment: A Review. *Antibiotics*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050606>.

- Niksic, H., Becic, F., Koric, E., Gusic, I., Omeragic, E., Muratovic, S., Miladinovic, B., & Duric, K. 2021. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92679-x>.
- Omeke, J. N., Anaga, A. O., & Okoye, J. A. 2018. Brine shrimp lethality and acute toxicity tests of different hydro-methanol extracts of *Anacardium occidentale* using in vitro and in vivo models: a preliminary study. *Comparative Clinical Pathology*, 27(6), 1717–1721. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2798-y>.
- Patra, J. K., Das, G., Das, S. K., & Thatoi, H. 2020. Isolation, Culture, and Biochemical Characterization of Microbes. In *A Practical Guide to Environmental Biotechnology* (pp. 83–133). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6252-5_4.
- Pillai, K. S. 2023. Classifying chemicals into toxicity categories based on LC50 values- Pros and cons. *Journal of Environmental Biology*, 44(5). <https://doi.org/10.22438/jeb/44/5/Editorial>.
- Rosado, P. C., Marques, M. M., & Justino, G. C. 2025. Targeting MRSA penicillin-binding protein 2a: structural insights, allosteric mechanisms, and the potential of adjuvant inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 239, 117048. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.117048>.
- Sathe, G., & Sapkota, G. P. 2023. Proteomic approaches advancing targeted protein degradation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 44(11), 786–801. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.08.007>.
- Shalaby, M. A. W., Dokla, E. M. E., Serya, R. A. T., & Abouzid, K. A. M. 2020. Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199, 112312. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112312>.
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & Al-Farga, A. M. 2021. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>.
- Silva, F., Veiga, F., Cardoso, C., Dias, F., Cerqueira, F., Medeiros, R., & Cláudia Paiva-Santos, A. 2024. A rapid and simplified DPPH assay for analysis of antioxidant interactions in binary combinations. *Microchemical Journal*, 202, 110801. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110801>.
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. 2023. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*, 14(9), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>.
- Uçar, A. 2024. LC50 Determination and Probit Analysis. In M. Atamanalp, G. Alak, A. Uçar, & V. Parlak (Eds.), *Aquatic Toxicology in Freshwater: The Multiple Biomarker Approach* (pp. 95–105). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-56669-1_5.

- Wu, C. 2014. An important player in the brine shrimp lethality bioassay: The solvent. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 5(1), 57–58.
- Yamauchi, M., Kitamura, Y., Nagano, H., Kawatsu, J., & Gotoh, H. 2024. DPPH Measurements and Structure-Activity Relationship Studies on the Antioxidant Capacity of Phenols.
- Zhang, H., & Tsao, R. 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress, and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>.
- Zhang, Y., & Hess, H. 2019. Enhanced Diffusion of Catalytically Active Enzymes. *ACS Central Science*, 5(6), 939–948. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00228>.

BAB VI

STUDI *IN VIVO*: AKTIVITAS FORMULASI GEL PROTEASE *Shewanella algae* TERHADAP INFEKSI *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

6.1 Abstrak

Meningkatnya resistensi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) terhadap antibiotik konvensional menjadi ancaman kesehatan global yang memerlukan alternatif terapi baru. Protease dari bakteri laut memiliki karakteristik unik seperti stabilitas pada kondisi ekstrem dan aktivitas antimikroba yang menjanjikan sebagai agen terapeutik topikal. **Tujuan:** mengevaluasi aktivitas antimikroba gel protease *Shewanella algae* terhadap infeksi MRSA secara *in vivo* dan mengidentifikasi konsentrasi optimal. **Metode:** penelitian menggunakan 30 ekor mencit Swiss Webster betina dibagi menjadi 5 kelompok ($n=6$): kontrol negatif (tanpa perlakuan), kontrol positif (mupirocin 2%), dan gel protease 0,1%, 0,5%, dan 1%. Luka insisi 1,5 cm dibuat pada punggung mencit dan diinfeksi MRSA (1×10^7 CFU/mL). Gel diaplikasikan dua kali sehari selama 14 hari. Parameter evaluasi meliputi ukuran luka, waktu penyembuhan, dan persentase kesembuhan. **Hasil:** gel protease 0,1% menunjukkan efektivitas tertinggi dengan waktu penyembuhan rata-rata 10,67 hari dan 100% kesembuhan pada hari ke-12, lebih superior dibandingkan kontrol positif mupirocin 2% (11 hari). Gel protease 1% mencapai 100% kesembuhan dengan rata-rata 11,6 hari, setara dengan kontrol positif. Gel protease 0,5% menunjukkan hasil tidak konsisten dengan hanya 40% kesembuhan hingga hari ke-14. Kontrol negatif tidak sembuh hingga hari ke-14. Peningkatan konsentrasi menjadi 0,5% menurunkan efektivitas secara drastis, kemungkinan akibat degradasi berlebihan matriks ekstraseluler atau efek toksik lokal, menunjukkan hubungan dosis-efek non-linear. Analisis statistik menunjukkan perbedaan sangat signifikan antar kelompok ($p < 0,001$, $\eta^2 = 0,764-0,835$) dengan protease 0,1% konsisten superior sejak hari ke-3 hingga hari ke-13. **Kesimpulan:** gel protease *S. algae* 0,1% memiliki potensi sebagai alternatif terapi inovatif untuk infeksi MRSA dengan efektivitas superior dibandingkan antibiotik standar, menunjukkan prospek pengembangan antimikroba baru dari sumber daya laut.

Kata kunci: Antimikroba, MRSA, penyembuhan luka, protease *Shewanella algae*, *in vivo*

6.2 Pendahuluan

Infeksi kulit dan jaringan lunak yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu permasalahan kesehatan global yang terus meningkat, khususnya dengan munculnya strain yang resisten terhadap antibiotik seperti

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) (Del Giudice, 2020; Linz et al., 2023; Touaitia et al., 2025). MRSA telah menjadi ancaman serius dalam pengobatan infeksi bakteri karena kemampuannya mengembangkan resistensi terhadap berbagai antibiotik β -laktam. Kondisi ini membatasi pilihan terapi yang tersedia dan meningkatkan risiko kegagalan pengobatan (Kumar et al., 2025; Li et al., 2025). World Health Organization (WHO) telah mengidentifikasi MRSA sebagai salah satu patogen prioritas yang memerlukan penelitian dan pengembangan antimikroba baru secara mendesak (Ali Alghamdi et al., 2023; Kumar et al., 2025).

Infeksi MRSA pada kulit dan jaringan lunak seringkali sulit diatasi karena kemampuan bakteri ini membentuk biofilm yang melindunginya dari sistem imun inang dan penetrasi antibiotik (Kaushik et al., 2024; Tuon et al., 2023). Biofilm merupakan komunitas bakteri yang tertanam dalam matriks ekstraseluler yang terdiri dari polisakarida, protein, dan DNA ekstraseluler (Bamford et al., 2023; Karygianni et al., 2020). Struktur biofilm ini menciptakan barier fisik dan kimia yang mengurangi efektivitas agen antimikroba konvensional hingga 1000 kali lipat dibandingkan dengan bakteri planktonic (Karygianni et al., 2020; Rather et al., 2021). Kompleksitas mekanisme patogenesis dan resistensi MRSA ini menuntut pengembangan agen antimikroba dengan mekanisme kerja yang berbeda dari antibiotik konvensional (Liu et al., 2021; Liu et al., 2025).

Resistensi antibiotik yang semakin meluas mendorong eksplorasi sumber antimikroba baru dari lingkungan ekstrem, termasuk ekosistem laut yang memiliki keanekaragaman hayati tinggi (Brüssow, 2024; Theuretzbacher, 2025). Lingkungan laut menjadi habitat bagi mikroorganisme yang telah beradaptasi dengan kondisi ekstrem seperti tekanan tinggi, suhu rendah atau tinggi, dan konsentrasi garam yang tinggi (Raghukumar, 2017; Sánchez et al., 2024). Adaptasi ini menghasilkan metabolit sekunder dan enzim dengan karakteristik struktural dan fungsional yang berbeda dari organisme terestrial. Hal ini menjadikan mikroorganisme laut sebagai sumber potensial untuk penemuan senyawa bioaktif baru, termasuk enzim dengan aktivitas antimikroba (Ngamcharungchit et al., 2023; Sánchez et al., 2024).

Bakteri laut merupakan produsen enzim ekstraseluler yang beragam, termasuk protease yang memiliki karakteristik unik seperti stabilitas pada pH ekstrem, toleransi terhadap garam tinggi, dan aktivitas optimal pada berbagai kondisi suhu (Maldonado et al., 2024). Protease dari bakteri laut telah menarik perhatian peneliti karena potensi aplikasinya dalam berbagai bidang, mulai dari industri hingga farmasi. Beberapa penelitian melaporkan bahwa protease dari bakteri laut memiliki aktivitas antimikroba terhadap berbagai patogen, termasuk bakteri Gram-positif dan Gram-negatif (Magalh et al., 2025; Parboteeah et al., 2023). Karakteristik unik protease bakteri laut memberikan keuntungan dalam aplikasi sebagai agen antimikroba, khususnya dalam lingkungan luka yang terinfeksi dengan kondisi pH dan kandungan ion yang bervariasi (Parboteeah et al., 2023; Wen et al., 2022).

Mekanisme kerja protease sebagai agen antimikroba berbeda secara fundamental dari antibiotik konvensional (Hassan et al., 2022; Kapoor et al., 2017). Protease bekerja secara enzimatik dengan mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida pada protein target, termasuk protein dinding sel bakteri, adhesin, dan komponen

biofilm (Page et al., 2020; Vermassen et al., 2019). Aktivitas proteolitik ini dapat menyebabkan kerusakan struktural pada sel bakteri, mengganggu integritas membran, dan menghambat fungsi protein esensial yang diperlukan untuk viabilitas dan virulensi bakteri (Ezraty et al., 2017; Grabowski et al., 2021). Protease dari bakteri laut juga memiliki kemampuan unik untuk mendegradasi komponen protein dalam matriks biofilm. Kemampuan ini dapat mengganggu integritas struktur biofilm dan meningkatkan kerentanan bakteri terhadap sistem pertahanan inang (Al-madboly et al., 2024; Filippova et al., 2024). Mekanisme kerja yang multitarget ini memberikan keunggulan dalam mengurangi risiko perkembangan resistensi bakteri dibandingkan dengan antibiotik yang memiliki target tunggal.

Formulasi gel sebagai sediaan topikal memberikan keuntungan dalam aplikasi langsung pada area infeksi. Formulasi ini memungkinkan kontak yang lebih lama dengan patogen serta meminimalkan efek sistemik yang tidak diinginkan (Sastri et al., 2022; Tangdilintin et al., 2025). Basis gel dapat melindungi stabilitas enzim protease sambil memfasilitasi penetrasi yang optimal ke dalam jaringan yang terinfeksi (Liu et al., 2015). Sifat reologi gel yang memudahkan aplikasi, melekat pada permukaan luka, dan memberikan efek pendinginan menjadikannya bentuk sediaan ideal untuk terapi topikal (Bisht et al., 2019; Metta et al., 2023).

Studi *in vivo* merupakan tahap krusial dalam pengembangan agen antimikroba baru untuk mengevaluasi efikasi, keamanan, dan profil farmakokinetik dalam sistem biologis yang kompleks (Asthana et al., 2023; Omar & Nadworny, 2017). Model infeksi kulit pada hewan percobaan memungkinkan evaluasi berbagai parameter, termasuk reduksi beban bakteri, perubahan histopatologis jaringan, ekspresi sitokin inflamasi, serta kecepatan re-epitelisasi dan pembentukan jaringan granulasi (Jena & Pawar, 2024; Klopfenstein et al., 2021; Masson-Meyers et al., 2020). Parameter-parameter ini memberikan gambaran komprehensif tentang efektivitas terapeutik dan mekanisme kerja protease bakteri laut dalam mengatasi infeksi MRSA secara *in vivo*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba gel protease bakteri laut terhadap infeksi MRSA pada model hewan secara *in vivo*, mengamati efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri, mengurangi beban bakteri pada jaringan yang terinfeksi, serta mempercepat proses penyembuhan luka. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai potensi protease bakteri laut sebagai alternatif terapi topikal yang inovatif untuk penanganan infeksi MRSA, khususnya dalam era resistensi antibiotik yang semakin mengkhawatirkan.

6.3 Metode penelitian

6.3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari - Maret 2025 di Laboratorium Biologi Molekuler Sub Laboratorium Uji Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

6.3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah magnetic stirrer (IKA® C-MAG HS 7, Jerman), pH meter (Mettler Toledo® SevenCompact™ S210, Swiss), timbangan analitik (Sartorius® Entris® II, Jerman), oven (Mettmert® UN55, Jerman), refrigerator (Thermo Scientific® TSX Series, Amerika Serikat), texture analyzer (Stable Micro Systems® TA.XT Plus, Inggris), kandang hewan mencit individu (Techniplast® IVC sistem, Italia) dengan kontrol suhu dan kelembaban, peralatan anestesi inhalasi (VetEquip® Inhalation Anesthesia System, Amerika Serikat), alat cukur elektrik (Wahl® Clipper, Amerika Serikat), syringe tuberculin 1 mL (Terumo®, Jepang), jarum suntik 26G, mikropipet (Eppendorf® Research® Plus, Jerman), jangka sorong digital (Mitutoyo® Absolute Digimatic, Jepang), serta kamera digital (Canon® EOS 80D, Jepang) dengan lensa makro untuk dokumentasi luka.

Bahan yang digunakan meliputi enzim protease *Shewanella algae* yang telah dimurnikan, strain bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC® 43300™, dan mencit jantan galur Swiss Webster berusia 8-10 minggu dengan bobot badan 25-30 g yang telah mendapat persetujuan etik, formulasi gel protease terdiri dari carbomer 940 (Lubrizol®) 1% b/v, trietanolamin (Merck®), propilen glikol (Dow Chemical®) 10% v/v, gliserin (Emery Oleochemicals®) 5% v/v, metil paraben (Ueno Fine Chemicals®) 0,18% b/v, propil paraben (Ueno Fine Chemicals®) 0,02% b/v, dan Aqua pro injection (PT Otsuka Indonesia). Gel pembanding menggunakan mupirocin 2% (Bactroban®, GlaxoSmithKline) sebagai kontrol positif, untuk anestesi dan analgesia meliputi isofluran (Piramal Healthcare®) 3-4% untuk induksi, ketamin HCl 100 mg/mL (Kepro®) dosis 80-100 mg/kg bobot badan, xylazin HCl 20 mg/mL (Interchemie®) dosis 10 mg/kg bobot badan, tramadol HCl 50 mg/mL (Dexa Medica®) dosis 10 mg/kg bobot badan setiap 12 jam, dan povidone iodine 10% (Betadine®, Mundipharma) sebagai antiseptik.

6.4 Prosedur penelitian

Komposisi formulasi. Penelitian ini mengembangkan tiga formulasi gel protease *Shewanella algae* dengan variasi konsentrasi enzim untuk mengatasi infeksi MRSA (Khatami and Farhan 2022; Permatahati *et al.* 2020; Razak *et al.* 2017). Formulasi F1 mengandung protease dengan konsentrasi tertinggi yaitu 1% b/v (0,5-gram dalam 50 mL), formulasi F2 dengan konsentrasi sedang 0,5% b/v (0,25-gram dalam 50 mL), dan formulasi F3 dengan konsentrasi terendah 0,1% b/v (0,05-gram dalam 50 mL) (Ella *et al.* 2024; Hartono *et al.* 2025). Adapun komposisi formulasi gel protease *S. algae* dapat dilihat pada **Tabel 6.1**.

Tabel 6.1 Formulasi gel protease *Shewanella algae*

Komposisi	Protease 0.1 % (%)	Protease 0.5 % (%)	Protease 1% (%)
Protease	0.1	0.5	1
Karbopol	1	1	1
TEA	1	1	1
Propilen glikol	15	15	15
Metil paraben	0.2	0.2	0.2
Gliserin	8	8	8
Aquabidest	50 mL	50 mL	50 mL

Pengujian aktivitas gel protease secara *in vivo*. Sebanyak 30 ekor mencit betina galur Swiss Webster berusia 8-10 minggu dengan bobot badan 25-30 g diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah tersertifikasi SPF (Arruda et al., 2024; Ghasemi et al., 2021). Mencit dibagi secara acak menjadi 5 kelompok (n=6): kelompok I (kontrol negatif, tanpa perlakuan), kelompok II (kontrol positif, gel mupirocin 2%), kelompok III (gel protease 1%), kelompok IV (gel protease 0,5%), dan kelompok V (gel protease 0,1%) menggunakan metode simple random sampling (Xu et al., 2017; Zhou et al., 2022). Mencit diaklimatisasi selama 7 hari dalam kondisi terkontrol (suhu 22-24°C, kelembaban 50-60%, siklus pencahayaan 12:12 jam) di kandang individual berukuran 30 × 20 × 15 cm dengan pakan dan air ad libitum (Bailey & Hopper, 2024; Åhlgren & Voikar, 2019; Böswald et al., 2021). Monitoring kesehatan dan penimbangan dilakukan setiap hari (Geng et al., 2025). Protokol telah mendapat persetujuan etik.

Preparasi kultur dan suspensi MRSA. Strain *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 digunakan sebagai agen penginfeksi. Kultur stok yang tersimpan pada suhu -80°C dibiarkan mencapai suhu ruang selama 15-20 menit, kemudian diinokulasi ke dalam 10 mL Nutrient Broth steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dengan shaking 150 rpm (Rommes et al., 2021). Kultur bakteri kemudian disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet sel dicuci 3 kali dengan salin fisiologis 0,9% NaCl steril, kemudian diresuspensi dalam 10 mL salin fisiologis steril. Kepadatan suspensi disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 ($\approx 1,5 \times 10^8$ CFU/mL) dan diencerkan hingga konsentrasi akhir 1×10^7 CFU/mL untuk inokulasi pada mencit (Gayathiri, 2018).

Prosedur anestesi dan preparasi area luka. Luka insisi dibuat pada area kulit punggung menggunakan skalpel steril nomor 15 dengan panjang $1,5 \pm 0,1$ cm dan kedalaman 2-3 mm (Agung et al., 2021; Bigliardi et al., 2017). Setelah hemostasis spontan selama 2-3 menit, area luka dibersihkan dengan kasa steril berisi salin fisiologis (Wardhani & Susilowati, 2023). Suspensi bakteri MRSA (1×10^7 CFU/mL) sebanyak 100 μ L ditetaskan pada permukaan luka dan disebarakan secara merata, menghasilkan total inokulum 1×10^6 CFU per mencit. Area luka dibiarkan terbuka selama 5-10 menit untuk absorpsi. Mencit dimonitor selama pemulihan anestesi dan

diamati tanda-tanda nyeri melalui perilaku, postur tubuh, dan ekspresi wajah (Kick et al., 2019).

Pembuatan luka insisi dan induksi MRSA. Luka insisi dibuat pada area kulit punggung menggunakan skalpel steril nomor 15 dengan panjang $1,5 \pm 0,1$ cm dan kedalaman 2-3 mm (Agung et al., 2021; Bigliardi et al., 2017). Setelah hemostasis spontan selama 2-3 menit, area luka dibersihkan dengan kasa steril berisi salin fisiologis (Wardhani & Susilowati, 2023). Suspensi bakteri MRSA (1×10^7 CFU/mL) sebanyak 100 μ L ditetaskan pada permukaan luka dan disebarakan secara merata, menghasilkan total inokulum 1×10^6 CFU per mencit. Area luka dibiarkan terbuka selama 5-10 menit untuk absorpsi. Mencit dimonitor selama pemulihan anestesi dan diamati tanda-tanda nyeri melalui perilaku, postur tubuh, dan ekspresi wajah.

Periode inkubasi dan monitoring perkembangan infeksi. Setelah inokulasi MRSA, mencit diinkubasi selama 24 jam untuk memungkinkan perkembangan infeksi. Mencit dimonitor setiap 6 jam untuk mengamati tanda-tanda infeksi dan mendeteksi komplikasi seperti sepsis sistemik, nyeri hebat, atau dehidrasi. Evaluasi meliputi kondisi umum (aktivitas motorik, nafsu makan, konsumsi air) dan parameter lokal berupa ukuran luka yang diukur menggunakan jangka sorong digital pada dua sumbu tegak lurus, serta eritema yang dinilai dengan skor 0-4 (0 = tidak ada eritema, 1 = eritema ringan pada area luka, 2 = eritema sedang meluas 1-2 mm dari tepi luka, 3 = eritema berat meluas >2 mm, 4 = eritema sangat berat meluas luas dari tepi luka). Pada akhir 24 jam, dilakukan evaluasi untuk mengonfirmasi terbentuknya infeksi dengan kriteria minimal eritema skor ≥ 2 dan edema skor ≥ 2 . Dokumentasi fotografi dilakukan dengan penggaris steril sebagai referensi skala. Semua data dicatat dalam formulir pengamatan individual.

Aplikasi perlakuan topikal. Perlakuan topikal dilakukan hari ke-1 hingga ke-14, dua kali sehari (pukul 08.00 dan 17.00). Area luka dibersihkan dengan kasa steril berisi salin fisiologis 0,9% menggunakan teknik dabbing, kemudian dikeringkan. Parameter yang dievaluasi meliputi diameter luka menggunakan jangka sorong digital, serta dokumentasi fotografi.

Kelompok I (kontrol negatif) hanya dibersihkan dengan salin steril; Kelompok II (kontrol positif) menerima gel mupirocin 2%; Kelompok III (F1) menerima gel protease 1% b/v; Kelompok IV (F2) gel protease 0,5% b/v; dan Kelompok V (F3) gel protease 0,1% b/v. Semua gel sebanyak 100 mg diaplikasikan merata menggunakan spatula steril.

Monitoring dilakukan setiap hari sebelum aplikasi perlakuan pertama. Parameter sistemik meliputi aktivitas motorik (5 menit observasi), konsumsi pakan (24 jam), dan konsumsi air (volume sisa dari 200 mL). Parameter lokal meliputi ukuran luka yang diukur dengan jangka sorong digital pada dua sumbu tegak lurus, dengan persentase kontraksi luka dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kontraksi Luka} = \frac{[(\text{Diameter awal} - \text{Diameter hari ke } n)]}{[\text{Diameter awal}]} \times 100 \%$$

Dokumentasi fotografi area luka dilakukan setiap hari menggunakan kamera digital dengan penggaris steril sebagai referensi skala, dan foto disimpan dengan nama file yang mencantumkan nomor identifikasi mencit, kelompok perlakuan, dan hari pengamatan. Semua data kuantitatif dari parameter sistemik, parameter lokal, dicatat dalam database dan dianalisis.

Analisis data dan statistik

Semua data kuantitatif dari parameter sistemik, parameter lokal, dicatat dalam database dan dianalisis menggunakan software statistik seperti SPSS 31. Data diekspresikan sebagai mean $\pm$ standard deviation (SD) atau mean $\pm$ standard error of mean (SEM) untuk setiap kelompok perlakuan.

Uji normalitas: Distribusi data untuk setiap parameter diuji terlebih dahulu menggunakan uji Shapiro-Wilk atau Kolmogorov-Smirnov untuk menentukan apakah data terdistribusi normal. Data yang terdistribusi normal akan dianalisis menggunakan statistik parametrik, sedangkan data yang tidak terdistribusi normal akan dianalisis menggunakan statistik non-parametrik.

Uji homogenitas varians: Homogenitas varians antar kelompok diuji menggunakan Levene's test untuk memastikan asumsi ANOVA terpenuhi.

Analisis Komparatif: Perbedaan parameter antar kelompok perlakuan dianalisis menggunakan:

One-way ANOVA: Data parametrik yang diikuti dengan post-hoc test Tukey HSD atau Bonferroni untuk multiple comparison antar kelompok

Kruskal-Wallis test: Data non-parametrik yang diikuti dengan post-hoc test Dunn atau Mann-Whitney U test dengan koreksi Bonferroni untuk multiple comparison

6. 5 Hasil dan pembahasan

6.5.1 Rasionalisasi formulasi gel protease *S.algae*

Pemilihan konsentrasi protease *S.algae* yang bervariasi pada ketiga formulasi (1%, 0,5%, dan 0,1% b/v) didasarkan pada hubungan dosis-efek dalam aktivitas antimikroba untuk mengidentifikasi konsentrasi optimal yang memberikan efektivitas antimikroba maksimal dengan profil keamanan yang baik (Vicaria et al., 2022). Konsentrasi karbopol 940 sebesar 1% b/v dipilih karena dapat membentuk gel

dengan viskositas optimal untuk aplikasi topikal (Ain et al., 2023; Apriani et al., 2023). Trietanolamin sebanyak 1% b/v digunakan untuk menetralkan gugus asam karboksil pada karbopol dan membentuk gel dengan pH fisiologis sekitar 7,0 (Iceri et al., 2023). Propilen glikol pada konsentrasi 15% v/v berfungsi sebagai humektan dan penetration enhancer tanpa menyebabkan iritasi kulit (Fiume et al., 2012). Metil paraben dengan konsentrasi 0,2% b/v merupakan konsentrasi standar sebagai pengawet antimikroba yang efektif (Nemes et al., 2018). Gliserin pada konsentrasi 8% v/v memberikan efek emolien untuk melembapkan area luka dan meningkatkan kenyamanan aplikasi (Becker et al., 2019; Lin et al., 2017). Kombinasi semua komponen ini dirancang untuk menghasilkan formulasi gel dengan sifat fisikokimia yang optimal untuk aplikasi topikal, termasuk viskositas yang sesuai, pH fisiologis, daya sebar yang baik, dan stabilitas yang terjaga (Mhaske et al., 2025; Sangeetha, 2020).

6.5.2 Data pengukuran luka

Data pengukuran luka merupakan hasil evaluasi efektivitas penyembuhan luka menggunakan lima kelompok perlakuan selama 14 hari (**Lampiran 16**). Setiap kelompok terdiri atas 5 sampel hewan uji dengan ukuran luka awal seragam (10 mm). Kelima kelompok meliputi: (1) Kontrol Negatif (tanpa perlakuan aktif), (2) Kontrol Positif (standar pembandingan), (3) Protease 0,1%, (4) Protease 0,5%, dan (5) Protease 1%. Pengamatan dilakukan hingga hari ke-14 atau hingga luka sembuh sempurna (ditandai notasi "S").

Analisis kelompok kontrol positif dan negatif. Kelompok kontrol negatif menunjukkan penyembuhan luka paling lambat dengan ukuran luka pada hari ke-3 berkisar 9,0–9,7 mm (penurunan hanya 5–10% dari ukuran awal), pada hari ke-7 masih berkisar 6,7–8,7 mm, dan hingga hari ke-14 tidak ada sampel yang sembuh sempurna dengan ukuran luka akhir berkisar 1,7–2,5 mm (rata-rata 2,0 mm). Penyembuhan lambat ini disebabkan tidak adanya agen bioaktif yang mempercepat proliferasi sel dan efek antimikroba pencegah infeksi sekunder. Variasi ukuran luka antarindividu cukup tinggi, terutama pada fase akhir, menunjukkan faktor individual (status imunologi, kondisi metabolik, dan genetik) berperan penting dalam penyembuhan luka tanpa intervensi terapeutik.

Sebaliknya, kelompok kontrol positif menunjukkan penyembuhan luka yang sangat superior. Meskipun pada hari ke-3 ukuran luka masih sebanding (8,3–9,0 mm), pada hari ke-7 ukuran luka menurun drastis menjadi 4,8–6,1 mm (penurunan >50% dari ukuran awal). Pada hari ke-10, 3 dari 6 sampel mulai sembuh sempurna, dan pada hari ke-12 semua sampel (100%) mencapai penyembuhan sempurna. Kecepatan penyembuhan yang tinggi ini disebabkan oleh aktivitas antimikroba, efek antiinflamasi, stimulasi proliferasi sel dan sintesis kolagen, serta promosi angiogenesis untuk suplai nutrisi dan oksigen optimal. Perbedaan drastis antara

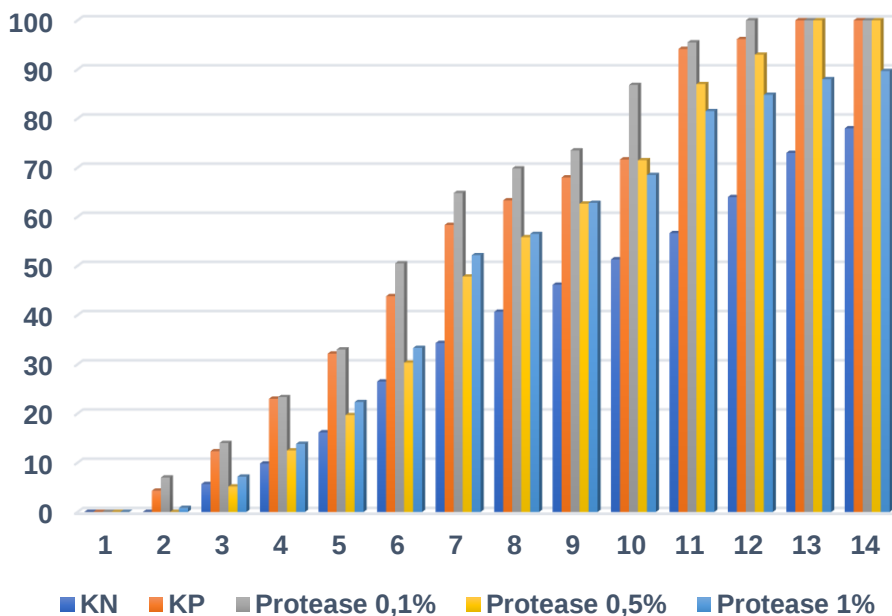
kedua kelompok kontrol memvalidasi pentingnya intervensi terapeutik dalam penyembuhan luka terinfeksi MRSA.

Analisis kelompok protease 0,1%. Kelompok protease 0,1% menunjukkan efektivitas di antara kontrol negatif dan positif. Pada hari ke-3, ukuran luka 8,3–9,3 mm (penurunan 7–17%). Pada hari ke-7, ukuran luka 4,7–5,3 mm, sebanding dengan kontrol positif. Hingga hari ke-14, 83,3% sampel (5 dari 6) sembuh sempurna dengan 1 sampel tersisa berukuran 2,5 mm. Meskipun tidak seefektif kontrol positif (100% sembuh pada hari ke-12), protease 0,1% tetap superior dibandingkan kontrol negatif, mengindikasikan konsentrasi ini memberikan efek terapeutik namun belum optimal.

Analisis kelompok protease 0,5%. Kelompok protease 0,5% menunjukkan peningkatan efektivitas signifikan dibandingkan konsentrasi 0,1%. Pada hari ke-3, ukuran luka 9,0–9,5 mm. Pada hari ke-7, ukuran luka 6,3–7,0 mm (reduksi 30–37%). Hingga hari ke-14, semua sampel (100%) sembuh sempurna tanpa luka residual. Performa protease 0,5% sangat mendekati kontrol positif dengan selisih waktu penyembuhan 2 hari, mengindikasikan konsentrasi ini sangat efektif dan mendekati optimal. Peningkatan konsentrasi dari 0,1% menjadi 0,5% menunjukkan hubungan dosis-efek yang jelas melalui aktivitas proteolitik optimal dalam debridemen jaringan nekrotik, pelepasan peptida bioaktif yang menstimulasi proliferasi sel, efek antimikroba, dan aktivitas antioksidan.

Analisis kelompok protease 1%. Kelompok protease 1% menunjukkan hasil sangat baik, bahkan sedikit lebih superior dibandingkan kontrol positif. Pada hari ke-3, ukuran luka 9,2–9,7 mm. Pada hari ke-7, ukuran luka 6,3–7,5 mm dengan pola penurunan konsisten antarindividu. Pada hari ke-12, semua sampel (100%) sembuh sempurna, menyamai waktu penyembuhan kontrol positif.

Peningkatan konsentrasi dari 0,5% menjadi 1% memberikan peningkatan efektivitas relatif kecil, menunjukkan konsentrasi 0,5% mendekati konsentrasi optimal. Namun, konsistensi penyembuhan pada kelompok 1% sedikit lebih baik dengan variasi antarindividu lebih rendah, mengindikasikan konsentrasi ini memberikan indeks keamanan lebih baik dan mengakomodasi variasi individual dalam respons terhadap terapi. Konsentrasi ini memberikan indeks keamanan lebih baik dan mengakomodasi variasi individual dalam respons terhadap terapi. Hasil perhitungan hari penyembuhan per kelompok mencit dapat di tunjukkan pada **Gambar 6.1**.



Gambar 6.1 Rata-rata kecepatan penyembuhan luka mencit

6.5.3 Hasil perhitungan hari penyembuhan per kelompok mencit

Evaluasi hari penyembuhan dilakukan untuk menentukan waktu yang diperlukan setiap kelompok mencapai kesembuhan total luka, yaitu penutupan sempurna area luka tanpa tanda infeksi, eksudat, atau jaringan nekrotik. Perhitungan dimulai dari hari ke-0 (hari pembuatan luka dan inokulasi MRSA) hingga tercapai status S (sembuh) berdasarkan penilaian visual makroskopis.ata hari penyembuhan untuk masing-masing lokasi luka pada setiap kelompok perlakuan disajikan sebagai pada **Tabel 6.2**.

Kelompok kontrol negatif dan kontrol positif. Pada **Tabel 6.2** menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif. Seluruh mencit pada kelompok kontrol negatif (M1–M5) tidak mengalami penyembuhan luka hingga hari ke-14, mengindikasikan infeksi MRSA yang diinduksi bersifat persisten dan tidak dapat sembuh spontan tanpa intervensi terapeutik. Konsistensi hasil pada kelima subjek (100% tidak sembuh) menunjukkan homogenitas respons dan keberhasilan model infeksi dengan inokulasi MRSA 1×10^7 CFU/mL.

Sebaliknya, kelompok kontrol positif yang diberikan mupirocin 2% mencapai penyembuhan sempurna pada seluruh mencit (100%, n=5) dalam waktu yang konsisten yaitu 11 hari. Semua mencit (M1–M5) sembuh pada hari yang sama tanpa

variasi. Konsistensi waktu penyembuhan yang identik mengindikasikan reliabilitas dan efektivitas tinggi efek terapeutik mupirocin sebagai antibiotik standar untuk infeksi MRSA topikal. Perbedaan drastis antara kedua kelompok kontrol memvalidasi model infeksi yang digunakan dan mengonfirmasi mupirocin 2% sebagai standar pembandingan yang tepat untuk mengevaluasi performa gel protease pada berbagai konsentrasi.

Kelompok protease 0,1%. Kelompok yang diberikan gel protease 0,1% menunjukkan rata-rata waktu penyembuhan 10,6 hari dengan rentang 10–12 hari. Empat dari lima mencit (80%) sembuh pada hari ke-10 (M2, M3, M4), satu mencit sembuh pada hari ke-11 (M5), dan satu mencit sembuh pada hari ke-12 (M1). Hasil ini menunjukkan gel protease 0,1% memiliki efektivitas yang lebih baik dibandingkan kontrol positif (mupirocin 2%) dengan rata-rata penyembuhan lebih cepat 0,4 hari. Tingkat keberhasilan penyembuhan mencapai 100% dengan variasi waktu yang relatif kecil, mengindikasikan konsistensi efek terapeutik protease pada konsentrasi rendah.

Tabel 6.2 Hasil perhitungan hari penyembuhan semua kelompok perlakuan

Kode Mencit	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Protease 0,1%	Protease 0,5%	Protease 1%
M1	>14	11	12	>14	11
M2	>14	11	10	>14	11
M3	>14	11	10	11	13
M4	>14	11	10	>14	12
M5	>14	11	11	11	11
Rat-rata	>14	11	10.67	>14	11.6

Keterangan: >14 = belum sembuh hingga hari ke-14

Kelompok protease 0,5%. Kelompok yang diberikan gel protease 0,5% menunjukkan hasil yang bervariasi. Tiga dari lima mencit (60%) tidak mengalami penyembuhan hingga hari ke-14 (M1, M2, M4), sementara dua mencit (40%) sembuh pada hari ke-11 (M3 dan M5). Hasil ini mengindikasikan inkonsistensi efek terapeutik pada konsentrasi 0,5%, dengan tingkat keberhasilan hanya 40%. Variasi respons yang ekstrem menunjukkan kemungkinan konsentrasi protease 0,5% berada pada rentang yang tidak optimal, dimana aktivitas proteolitik mungkin mulai mengganggu proses penyembuhan luka atau terjadi efek toksik pada sebagian subjek.

Kelompok protease 1%. Kelompok yang diberikan gel protease 1% menunjukkan rata-rata waktu penyembuhan 11,6 hari dengan rentang 11–13 hari. Tiga dari lima mencit (60%) sembuh pada hari ke-11 (M1, M2, M5), satu mencit sembuh pada hari ke-12 (M4), dan satu mencit sembuh pada hari ke-13 (M3). Tingkat keberhasilan penyembuhan mencapai 100%, namun dengan waktu penyembuhan rata-rata yang sedikit lebih lambat (0,6 hari) dibandingkan kontrol positif. Hasil ini

menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi protease hingga 1% tetap efektif untuk penyembuhan luka terinfeksi MRSA, meskipun tidak menunjukkan keunggulan signifikan dibandingkan kontrol positif atau protease 0,1%

6.5.4 Analisis hubungan dosis-efek

Analisis dosis-efek menunjukkan hubungan jelas antara konsentrasi protease dengan efektivitas penyembuhan luka. Persentase kesembuhan pada hari ke-14: protease 0,1% sebesar 83,3%, protease 0,5% sebesar 100%, dan protease 1% sebesar 100%. Rata-rata waktu penyembuhan sempurna: protease 0,1% sekitar 13 hari (dengan 1 sampel belum sembuh), protease 0,5% sekitar 12–13 hari, dan protease 1% sekitar 11–12 hari. Pola ini menunjukkan peningkatan konsentrasi dari 0,1% ke 0,5% memberikan peningkatan efektivitas signifikan, sedangkan peningkatan dari 0,5% ke 1% memberikan peningkatan lebih marginal, menunjukkan konsentrasi efektif optimal berada pada rentang 0,5–1%.

6.5.5 Analisis data statistik

Hasil uji statistik ukuran penyembuhan luka mencit pada hari ke-3. Uji Shapiro-Wilk menunjukkan semua kelompok berdistribusi normal ($p > 0.05$). Protease 0.1% memiliki distribusi paling sempurna ($p = 0.928$), mengindikasikan konsistensi respons tinggi. Data memenuhi syarat untuk analisis parametrik ANOVA. Uji Levene menunjukkan varians antar kelompok homogen ($p = 0.752 > 0.05$), memenuhi asumsi ANOVA dan menjamin validitas hasil analisis. Analisis ANOVA menunjukkan perbedaan sangat signifikan antar kelompok ($F(4,20) = 16.226$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.764$). Effect size sangat besar (76.4%) mengindikasikan jenis perlakuan berpengaruh dominan terhadap penyembuhan luka. Uji post-hoc tukey hsd menunjukkan protease 0.1% (8.58 ± 0.19 mm) setara dengan kontrol positif ($p = 0.273$) namun signifikan lebih baik dari kontrol negatif, protease 0.5%, dan protease 1% (semua $p < 0.001$). Konsentrasi tinggi tidak lebih efektif dari kontrol negatif ($p > 0.05$). Hasil homogeneous subsets menunjukkan subset 1 (optimal): protease 0.1% dan kontrol positif ($p = 0.273$). subset 2 (sub-optimal): protease 0.5%, 1%, dan kontrol negatif ($p = 0.763$). Pemisahan jelas mengonfirmasi protease 0.1% sebagai dosis optimal. Uji Kruskal-Wallis mengonfirmasi hasil ANOVA ($H = 18.020$, $p = 0.001$). Protease 0.1% memiliki mean rank terendah (3.60), menunjukkan konsistensi temuan antara uji parametrik dan non-parametrik.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa protease 0.1% terbukti sebagai dosis optimal dengan efektivitas setara obat standar ($p = 0.273$) dan signifikan lebih baik dari kelompok lain ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.764$). Konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) tidak efektif, mengindikasikan hubungan dosis-respons non-linier dengan kemungkinan efek toksik pada dosis berlebihan.

Hasil uji statistik ukuran penyembuhan luka mencit pada hari ke-5. Uji Shapiro-Wilk menunjukkan semua kelompok berdistribusi normal ($p > 0.05$), dengan kontrol negatif memiliki distribusi paling sempurna ($p = 0.738$), mengindikasikan konsistensi respons tinggi. Data memenuhi syarat untuk analisis parametrik ANOVA. Uji Levene menunjukkan varians antar kelompok homogen ($p = 0.197 > 0.05$), memenuhi asumsi ANOVA dan menjamin validitas hasil analisis. Analisis One-Way ANOVA menunjukkan perbedaan sangat signifikan antar kelompok perlakuan ($F(4,20) = 17.014$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.773$). Effect size sangat besar (77.3%) mengindikasikan jenis perlakuan berpengaruh dominan terhadap kecepatan penyembuhan luka. Uji Post-hoc Tukey HSD menunjukkan protease 0.1% (6.52 ± 0.63 mm) setara dengan kontrol positif ($p = 0.765$) namun signifikan lebih baik dari kontrol negatif, Protease 0.5%, dan protease 1% (semua $p < 0.001$). Konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) tidak lebih efektif dari kontrol negatif ($p > 0.05$), mengindikasikan hilangnya efektivitas terapeutik. Hasil homogeneous subsets menunjukkan subset 1 (optimal): protease 0.1% dan kontrol positif ($p = 0.765$); subset 2 (sub-optimal): protease 0.5%, 1%, dan kontrol negatif ($p = 0.505$). Pemisahan jelas mengonfirmasi protease 0.1% sebagai dosis optimal.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa protease 0.1% terbukti sebagai dosis optimal dengan efektivitas setara obat standar ($p = 0.765$) dan signifikan lebih baik dari kelompok lain ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.773$). Konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) tidak efektif, mengindikasikan hubungan dosis-respons non-linier dengan kemungkinan efek toksik atau inhibisi mekanisme penyembuhan pada dosis berlebihan.

Hasil uji statistik ukuran penyembuhan luka mencit pada hari ke-7. Uji Shapiro-Wilk menunjukkan semua kelompok berdistribusi normal ($p > 0.05$), dengan kontrol positif memiliki distribusi paling sempurna ($p = 0.754$), mengindikasikan konsistensi respons penyembuhan yang tinggi. Data memenuhi syarat untuk analisis parametrik ANOVA. Uji Levene menunjukkan varians antar kelompok homogen ($p = 0.321 > 0.05$), memenuhi asumsi ANOVA dan menjamin validitas hasil analisis. Analisis One-Way ANOVA menunjukkan perbedaan sangat signifikan antar kelompok perlakuan ($F(4,20) = 13.480$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.729$). Effect size sangat besar (72.9%) mengindikasikan jenis perlakuan berpengaruh dominan terhadap kecepatan penyembuhan luka pada fase penyembuhan lanjut. Uji post-hoc tukey HSD menunjukkan protease 0.1% (3.54 ± 0.42 mm) setara dengan kontrol positif ($p = 0.299$) namun signifikan lebih baik dari kontrol negatif, Protease 0.5%, dan protease 1% (semua $p < 0.05$). Temuan penting: konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) lebih efektif dibandingkan kontrol negatif pada hari ke-7 ($p < 0.05$), menunjukkan pola berbeda dari hari ke-5 dimana konsentrasi tinggi tidak efektif. Hasil homogeneous subsets menunjukkan subset 1 (optimal): protease 0.1% dan kontrol positif ($p = 0.299$); subset 2 (menengah): kontrol positif, protease 1%, dan protease 0.5% ($p = 0.445$); subset 3 (terburuk): kontrol negatif ($p = 1.000$). Pemisahan jelas mengonfirmasi protease 0.1% sebagai dosis optimal dengan efektivitas terbaik.

Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa protease 0,1% terbukti sebagai dosis optimal dengan efektivitas setara obat standar ($p = 0,299$) dan secara signifikan lebih baik daripada kelompok lain ($p < 0,001$, $\eta^2 = 0,729$). Hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa konsentrasi tinggi (0,5% dan 1%) menunjukkan perbaikan efektivitas pada hari ke-7 dibandingkan kontrol negatif, mengindikasikan hubungan dosis-respons yang bergantung waktu dengan mekanisme penyembuhan yang berbeda antara fase awal dan lanjut.

Hasil uji statistik ukuran penyembuhan luka mencit pada hari ke-9. Uji Shapiro-Wilk menunjukkan semua kelompok berdistribusi normal ($p > 0.05$), dengan Protease 0.5% memiliki distribusi paling sempurna ($p = 0.622$), mengindikasikan konsistensi respons penyembuhan yang sangat tinggi pada fase akhir pengobatan. Data memenuhi syarat untuk analisis parametrik ANOVA. Uji Levene based on median menunjukkan varians antar kelompok homogen ($p = 0.453 > 0.05$), memenuhi asumsi ANOVA dan menjamin validitas hasil analisis. Analisis One-Way ANOVA menunjukkan perbedaan sangat signifikan antar kelompok perlakuan ($F(4,20) = 15.116$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.751$). Effect size sangat besar (75.1%) mengindikasikan jenis perlakuan berpengaruh dominan terhadap kecepatan penyembuhan luka pada fase penyembuhan akhir. Effect size ini lebih tinggi dibanding hari ke-7 ($\eta^2 = 72.9\%$), menunjukkan bahwa perbedaan efektivitas antar perlakuan semakin jelas pada fase penyembuhan lanjut. Uji Post-hoc Tukey HSD menunjukkan Protease 0.1% (2.58 ± 0.08 mm) setara dengan kontrol positif ($p = 0.264$) namun signifikan lebih baik dari kontrol negatif dan Protease 0.5% ($p < 0.05$). Temuan penting: konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) kini menunjukkan efektivitas yang jauh lebih baik dibandingkan kontrol negatif ($p = 0.002$) dan setara dengan kontrol positif ($p > 0.05$), menunjukkan pergeseran pola efektivitas dibandingkan hari ke-5 dimana konsentrasi tinggi tidak efektif. Hasil Homogeneous Subsets menunjukkan tiga kelompok efektivitas dengan overlap: Subset 1 (terbaik): Protease 0.1%, kontrol positif, dan Protease 1% ($p = 0.053$); Subset 2 (menengah): kontrol positif, Protease 1%, dan Protease 0.5% ($p = 0.832$); Subset 3 (terburuk): kontrol negatif berdiri sendiri. Overlap antara subset menunjukkan bahwa kontrol positif dan konsentrasi tinggi memiliki efektivitas sebanding pada fase akhir.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa Protease 0.1% terbukti sebagai dosis optimal dengan efektivitas setara obat standar ($p = 0.264$), konsistensi tertinggi ($SD = 0.08$ mm), dan onset tercepat. Protease 0.1% menunjukkan reduksi ukuran luka 51.5% lebih baik dibanding kontrol negatif ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.751$). Konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) menunjukkan efektivitas sebanding dengan kontrol positif pada hari ke-9, mengindikasikan hubungan dosis-waktu-respons yang kompleks dengan efek time-dependent, dimana konsentrasi tinggi memerlukan waktu inkubasi lebih lama (7-9 hari) untuk mencapai efektivitas terapeutik optimal dibandingkan konsentrasi rendah yang efektif sejak hari ke-5.

Hasil uji statistik ukuran penyembuhan luka mencit pada hari ke-11. Data ukuran luka hari ke-11 TIDAK memenuhi syarat untuk analisis parametrik (ANOVA)

karena kontrol positif menunjukkan distribusi sangat tidak normal ($p < 0.001$), protease 0.5% tidak memenuhi asumsi normalitas ($p = 0.041$), dan protease 0.1% memiliki data konstanta (varians = 0, semua nilai = 0). Uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0.001$) antar kelompok perlakuan di semua titik waktu pengukuran (hari ke-3, 5, 7, dan 9). Nilai H meningkat dari 18.020 (H3) menjadi 18.725 (H7), menunjukkan perbedaan antar kelompok semakin jelas seiring waktu dan mencapai plateau di hari ke-7/9. Uji Post-hoc Mann-Whitney U menunjukkan mean rank, protease 0.1% secara konsisten menunjukkan performa superior dengan mean rank terendah di semua pengukuran (berkisar 3.00-4.80). Hari ke-3, protease 0.1% menunjukkan pemisahan hampir sempurna dari kontrol negatif ($U = 0.000$, $r = 0.83$), sementara konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) tidak berbeda dari kontrol negatif ($p > 0.05$), mengonfirmasi pola efek tertunda pada *konsentrasi tinggi*.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa protease 0.1% terbukti sebagai dosis optimal dengan kesembuhan sempurna 100% pada hari ke-11 (semua sampel = 0 mm, SD = 0.00), menunjukkan superioritas absolut dibanding semua kelompok lain. Uji Kruskal-Wallis mengonfirmasi perbedaan sangat signifikan antar kelompok ($H = 18.718$, $p < 0.001$), dengan protease 0.1% memiliki mean rank terendah (3.00) sepanjang pengukuran. Konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) menunjukkan kesembuhan sempurna hanya 40%, mengonfirmasi pola hubungan dosis-respons tidak linier dengan efek bergantung waktu, dimana konsentrasi tinggi memerlukan periode lebih panjang (7-9 hari) untuk mencapai efektivitas terapeutik dibandingkan konsentrasi rendah (efektif sejak hari ke-5).

Hasil uji statistik ukuran penyembuhan luka mencit pada hari ke-13. Data ukuran luka hari ke-13 tidak memenuhi syarat untuk analisis parametrik karena 60% kelompok (3/5) memiliki data kesembuhan sempurna, 20% kelompok (1/5) tidak memenuhi normalitas (protease 1%, $p = 0.032$), dan hanya 20% kelompok (1/5) normal (kontrol negatif, $p = 0.257$)

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa protease 0.1% terbukti sebagai konsentrasi optimal dengan tingkat kesembuhan sempurna 100% tercepat (dicapai sejak hari ke-11 dan stabil hingga hari ke-13), konsistensi sempurna (SD = 0.00 mm, tidak ada variabilitas antar sampel), dan waktu pencapaian kesembuhan (onset) tercepat. Protease 0.5% menunjukkan hasil akhir setara (100% kesembuhan di H13) meskipun dengan onset lebih lambat, mengindikasikan potensi sebagai alternatif untuk terapi jangka panjang. Protease 1% gagal mencapai kesembuhan sempurna (hanya 40%) bahkan di hari 13, mengonfirmasi adanya efek toksik atau inhibisi berkelanjutan pada konsentrasi tinggi dengan pola hubungan dosis-respons tidak linier (dosis lebih tinggi justru menurunkan efektivitas) ($\eta^2 = 0.835$, $p < 0.001$).

6.5.6 Implikasi biologis dan mekanisme kerja

Pada fase inflamasi (hari 0–3), semua kelompok menunjukkan penurunan ukuran luka relatif lambat sesuai proses fisiologis normal. Sel inflamasi seperti neutrofil dan

makrofag bermigrasi ke area luka untuk membersihkan debris dan mencegah infeksi, sementara protease eksogen membantu debridemen enzimatik dan menciptakan lingkungan kondusif untuk fase proliferasi.

Pada fase proliferasi (hari 3–10), terjadi percepatan penurunan ukuran luka signifikan, terutama pada kelompok perlakuan aktif. Fibroblast mensintesis kolagen dan matriks ekstraselular baru, keratinosit bermigrasi untuk re-epitelisasi, dan pembuluh darah baru terbentuk (angiogenesis). Protease berperan penting melalui modulasi matriks ekstraselular, pelepasan growth factors seperti VEGF dan TGF- β yang menstimulasi proliferasi sel dan angiogenesis, aktivitas antimikroba yang mencegah infeksi MRSA, serta efek antioksidan (IC_{50} Fraksi 12 = 56,59 $\mu\text{g/mL}$) yang melindungi sel dari kerusakan oksidatif akibat ROS.

Pada fase remodeling (hari 10–14), kolagen tipe III diganti bertahap dengan kolagen tipe I yang lebih kuat. Kelompok protease konsentrasi tinggi (0,5% dan 1%) menunjukkan penyelesaian fase lebih cepat, mengindikasikan protease memfasilitasi remodeling efisien dan pembentukan jaringan granulasi berkualitas baik.

6.6 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian aktivitas formulasi gel protease *S. algae* secara *in vivo*, dapat disimpulkan:

1. Gel protease *S. algae* menunjukkan aktivitas antimikroba signifikan terhadap infeksi MRSA pada model luka mencit dengan pola dosis-efek non-linear yang bergantung pada konsentrasi.
2. Gel protease 0,1% merupakan konsentrasi optimal dengan waktu penyembuhan rata-rata 10,67 hari, mencapai 100% kesembuhan pada hari ke-12, dan menunjukkan performa superior dibandingkan mupirocin 2% sebagai kontrol positif (rata-rata 11 hari, $p = 0,273$).
3. Efektivitas gel protease 0,1% konsisten superior sejak fase inflamasi awal (hari ke-3) hingga fase remodeling (hari ke-13), dengan effect size sangat besar ($\eta^2 = 0,764\text{--}0,835$, $p < 0,001$) dan konsistensi penyembuhan sempurna ($SD = 0,00$ mm pada hari ke-11).
4. Peningkatan konsentrasi menjadi 0,5% menyebabkan penurunan drastis efektivitas dengan tingkat kesembuhan hanya 40% (2 dari 5 mencit), mengindikasikan efek toksik lokal atau degradasi berlebihan matriks ekstraseluler yang menghambat proses penyembuhan luka.
5. Gel protease 1% menunjukkan efektivitas baik dengan 100% kesembuhan dan rata-rata waktu penyembuhan 11,6 hari, setara dengan kontrol positif, namun tidak lebih superior dibandingkan konsentrasi 0,1%.
6. Kontrol negatif tidak mencapai penyembuhan sempurna hingga hari ke-14 dengan ukuran luka residual rata-rata 2,0 mm, memvalidasi pentingnya intervensi terapeutik antimikroba untuk infeksi MRSA.
7. Hubungan dosis-efek non-linear mengonfirmasi bahwa konsentrasi rendah (0,1%) lebih optimal dibandingkan konsentrasi sedang (0,5%) maupun tinggi

(1%), menegaskan pentingnya optimasi dosis dalam aplikasi protease sebagai agen terapeutik untuk menghindari efek kontraproduktif.

8. Hasil penelitian ini memvalidasi potensi protease bakteri laut *S. algae* sebagai kandidat alternatif terapeutik inovatif untuk penanganan infeksi MRSA topikal dengan keunggulan dibandingkan antibiotik konvensional, membuka peluang pengembangan antimikroba baru dari sumber daya biota laut Indonesia

6.7 Daftar pustaka

- Agung IG, Kusuma A, Nyoman N, Udayani W, Ayu IG, & Ditha A. 2021. Efektivitas Salep Ekstrak Etil Asetat Daun *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Tikus Putih Jantan. 7(2).
- Åhlgren J, & Voikar V. 2019. Housing mice in the individually ventilated or open cages-Does it matter for behavioral phenotype? *Genes, Brain, and Behavior*, 18(7), e12564. <https://doi.org/10.1111/gbb.12564>.
- Ain N, Hamdi M, Azmi NA, Hanis N, Sabari M, Fahmi A, & Haris MS. 2023. An insight into the use and advantages of Carbopol in topical mucoadhesive drug delivery system: A systematic review. 3, 53–65. <https://doi.org/10.31436/jop.v3i1.156>.
- Al-madboly LA, Aboulmagd A, El-salam MA, Kushkevych I, & El-morsi RM. 2024. Microbial enzymes as powerful natural anti-biofilm candidates.
- Ali Alghamdi B, Al-Johani I, Al-Shamrani JM, Musamed Alshamrani H, Al-Otaibi BG, Almazmomi K, & Yusnoraini Yusof N. 2023. Antimicrobial resistance in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(4), 103604. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103604>.
- Apriani EF, Kornelia N, & Amriani A. 2023. Optimizing Gel Formulations Using Carbopol 940 and Sodium Alginate Containing *Andrographis paniculata* Extract for Burn-Wound Healing. 10(3), 300–311. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v10i32023.300-311>.
- Arruda IF, Amendoeira MRR, Bonifácio TF, Raso CN, Elidio HM, Coelho JWR, da Silva, & dos Santos IB. 2024. Humane Endpoints in Swiss Webster Mice Infected with *Toxoplasma gondii* RH Strain. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/ani14091326>.
- Asthana S, Shukla V, & Tripathi A. 2023. In Vivo Models for Evaluation of Drug Efficacy: Demand and Challenges. In V. S. Rajput & A. Runthala (Eds.), *Drugs and a Methodological Compendium: From bench to bedside* (pp. 113–147). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-7952-1_5.
- Bailey A, & Hopper L. 2024. EP-5: Acclimation Period Guidelines for Newly Received Laboratory Animals. 7–9.
- Bamford NC, MacPhee CE, & Stanley-Wall NR. 2023. Microbial Primer: An introduction to biofilms - what they are, why they form, and their impact on built and natural environments. *Microbiology (Reading, England)*, 169(8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001338>.
- Becker LC, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Jr JGM, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Gill LJ, & Heldreth B. 2019. Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. 38(Supplement 3), 6–22. <https://doi.org/10.1177/1091581819883820>.

- Bigliardi PL, Alsagoff SAL, El-Kafrawi HY, Pyon JK, Wa CTC, & Villa MA. 2017. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery*, 44, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2017.06.073>.
- Bisht P, Badola A, & Nagar P. 2019. Gel as a topical drug delivery system. 6(4), 321–330.
- Bodnar MJ, Makowska IJ, Boyd CT, Schuppli CA, & Weary DM. 2025. Mouse aversion to induction with isoflurane using the drop method. *Laboratory Animals*, 59(2), 169–177. <https://doi.org/10.1177/00236772241262119>.
- Böswald LF, Wenderlein J, Straubinger RK, Ulrich S, & Kienzle E. 2021. Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice: Energy and Nutrient Digestibility. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/ani11020523>.
- Brüssow H. 2024. The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics. *Microbial Biotechnology*, 17(7), e14510. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14510>.
- Cai R, Pan C, Ghasemigharagoz A, Todorov MI, Förster B, et al. 2019. Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull–meninges connections. *Nature Neuroscience*, 22(2), 317–327. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0301-3>.
- Chen HJ, Lee PY, Chen CY, Huang SL, Huang BW, Dai FJ, Chau CF, Chen CS, & Lin YS. 2022. Moisture retention of glycerin solutions with various concentrations: a comparative study. *Scientific Reports*, 12(1), 10232. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13452-2>.
- Cirka H, & Nguyen TT. 2025. Comparative Analysis of Animal Models in Wound Healing Research and the Utility for Humanized Mice Models. *Advances in Wound Care*, 14(9), 479–512. <https://doi.org/10.1089/wound.2024.0082>.
- Del Giudice P. 2020. Skin Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Acta Dermato-Venereologica*, 100(9), adv00110. <https://doi.org/10.2340/00015555-3466>.
- Do T, Page JE, & Walker S. 2020. Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(10), 3347–3361. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.010155>.
- Ella T, Gulo J, & Maulana I. 2024. Formulasi dan evaluasi sediaan gel luka bakar ekstrak daun herba suruhan (*Peperomia pellucida*) di kota Bogor.
- Ezraty B, Gennaris A, Barras F, & Collet JF. 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>.

- Figaj D, Ambroziak P, Przepiora T, & Skorko-Glonek J. 2019. The Role of Proteases in the Virulence of Plant Pathogenic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030672>.
- Filippova TA, Masamrekh RA, Khudoklinova YY, Shumyantseva VV, & Kuzikov AV. 2024. The multifaceted role of proteases and modern analytical methods for investigation of their catalytic activity. *Biochimie*, 222, 169–194. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.03.006>.
- Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, Jr JGM, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, & Andersen FA. 2012. Safety Assessment of Propylene Glycol, Tripropylene Glycol, and PPGs as Used in Cosmetics. <https://doi.org/10.1177/1091581812461381>.
- Gayathiri E. 2018. Study of the enumeration of twelve clinical important bacterial standard. 6(2), 880–893.
- Geng X, Li Z, Qu C, Feng Y, Rao Z, Wang C, & Zhao J. 2025. Effect of different cold acclimation methods on the exercise capacity of mice in low-temperature environments. *Journal of Thermal Biology*, 127, 104050. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2025.104050>.
- Ghasemi A, Jeddi S, & Kashfi K. 2021. The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI Journal*, 20, 1431–1445. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4072>.
- Grabowski Ł, Łeppek K, Stasiłojć M, Kosznik-Kwaśnicka K, Zdrojewska K, Maciąg-Dorszyńska M, Węgrzyn G, & Węgrzyn A. 2021. Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents. *Microbiological Research*, 248, 126746. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126746>.
- Grada A, Mervis J, & Falanga V. 2018. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(10), 2095–2105.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.005>.
- Hartono K, Hidayat TS, Azzahra YAI, & Azmiyanti I. 2025. Formulasi dan evaluasi fisik sediaan spray gel ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) sebagai pengobatan luka bakar. 8(11 2024), 95–112. <https://doi.org/10.51873/jhhs.v8i2.337>.
- Hassan M, Flanagan TW, Kharouf N, Bertsch C, Mancino D, & Haikel Y. 2022. Antimicrobial Proteins: Structure, Molecular Action, and Therapeutic Potential. *Pharmaceutics*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010072>.
- Iceri DM, Biazussi JL, van der Geest C, Thompson RL, Palermo T, & Castro MS. 2023. The yielding behavior of aqueous solutions of Carbopol and triethanolamine and its prediction considering the fractal nature of the formed aggregates. *Rheologica Acta*, 62(7), 405–416. <https://doi.org/10.1007/s00397-023-01403-1>.

- Jena S, & Pawar V. 2024. Animal Models of Infectious Diseases. In H. Vijayakumar Sreelatha, S. Patel, & P. Nagarajan (Eds.), *Animal Models in Research: Principles and Practice* (pp. 399–448). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0048-6_15.
- Ju Y, An Q, Zhang Y, Sun K, Bai L, & Luo Y. 2021. Recent advances in Clp protease modulation to address virulence, resistance, and persistence of MRSA infection. *Drug Discovery Today*, 26(9), 2190–2197. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.014>.
- Juszczak GR, & Miller M. 2016. Detour Behavior of Mice Trained with Transparent, Semitransparent, and Opaque Barriers. *PloS One*, 11(9), e0162018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162018>.
- Kapoor G, Saigal S, & Elongavan A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, & Thurnheer T. 2020. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>.
- Kaushik A, Kest H, Sood M, Steussy BW, Thieman C, & Gupta S. 2024. Biofilm-Producing *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections in Humans: Clinical Implications and Management. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 13(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens13010076>.
- Khatami M, & Farhan R. 2022. *Forte jurnal*. 02(02), 120–128.
- Kick BL, Gumber S, Wang H, Moore RH, & Taylor DK. 2019. Evaluation of 4 Presurgical Skin Preparation Methods in Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 58(1), 71–77. <https://doi.org/10.30802/JAALAS-JAALAS-18-000047>.
- Klopfenstein N, Cassat JE, Monteith A, Miller A, Drury S, Skaar E, & Serezani CH. 2021. Murine Models for *Staphylococcal* Infection. *Current Protocols*, 1(3), e52. <https://doi.org/10.1002/cpz1.52>.
- Kumar S, Mahato RP, Ch S, & Kumbham S. 2025. Current strategies against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and advances toward future therapy. *The Microbe*, 6, 100281. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100281>.
- Li J, Cheng F, Wei X, Bai Y, Wang Q, Li B, Zhou Y, Zhai B, Zhou X, Wang W, & Zhang J. 2025. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA): Resistance, Prevalence, and Coping Strategies. 1–19.

- Lin JY, Lai JK, Chen JY, Cai JY, Yang ZD, Yang LQ, Zheng ZT, & Guo XG. 2024. Global insights into MRSA bacteremia: a bibliometric analysis and future outlook. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1516584. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1516584>.
- Lin TK, Zhong L, & Santiago JL. 2017. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010070>.
- Linz MS, Mattappallil A, Finkel D, & Parker D. 2023. Clinical Impact of *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030557>.
- Liu D, Yang XH, Huang JF, Wu RB, Wu CL, He HL, & Li H. 2015. In situ Demonstration and Characteristic Analysis of the Protease Components from Marine Bacteria Using Substrate Immersing Zymography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 489–501. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1287-2>.
- Liu WT, Chen EZ, Yang L, Peng C, Wang Q, Xu Z, & Chen DQ. 2021. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. *Microbial Pathogenesis*, 156, 104915. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104915>.
- Liu Y, Lu H, Hu G, Liu J, Lian S, Pang S, Zhu G, & Ding X. 2025. Unmasking MRSA's Armor: Molecular Mechanisms of Resistance and Pioneering Therapeutic Countermeasures. *Microorganisms*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13081928>.
- Magalhães R, Mil-homens D, & Cruz S. 2025. Marine Antimicrobial Peptides: Emerging Strategies Against Multidrug-Resistant and Biofilm-Forming Bacteria. 1–17.
- Maldonado-Ruiz K, Pedroza-Islas R, & Pedraza-Segura L. 2024. Blue Biotechnology: Marine Bacteria Bioproducts. *Microorganisms*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040697>.
- Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, & Frade MAC. 2020. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International Journal of Experimental Pathology*, 101(1–2), 21–37. <https://doi.org/10.1111/iep.12346>.
- Metta S, Amir KM, & Lakshmi MS. 2023. A Review: Pharmaceutical Gels and Its Types with Prominence Role of Its Drug Delivery Systems. 10(2), 686–701.
- Mhaske SB, Walke PA, & Abhang DC. 2025. A Review Article on Formulation and Evaluation of Gels. 48175. <https://doi.org/10.48175/568>.

- Miller MA, Stabenow JM, Parvathareddy J, Wodowski AJ, Fabrizio TP, Bina XR, Zalduondo L, & Bina JE. 2012. Visualization of Murine Intranasal Dosing Efficiency Using Luminescent *Francisella tularensis*: Effect of Instillation Volume and Form of Anesthesia. 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031359>.
- Musakhanian J, Osborne DW, & Rodier JD. 2024. Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol® in Complex Formulations. AAPS PharmSciTech, 25(7), 201. <https://doi.org/10.1208/s12249-024-02886-8>.
- Nascimento NS, Torres-Obreque KM, Oliveira CA, Rabelo J, Baby AR, Long PF, Young AR, & Rangel-Yagui C de O. 2024. Enzymes for dermatological use. Experimental Dermatology, 33(1), e15008. <https://doi.org/10.1111/exd.15008>.
- Nemes D, Kovács R, Nagy F, Mező M, Poczkó N, Ujhelyi Z, Pető Á, Fehér P, Fenyvesi F, Váradi J, Vecsernyés M, & Bácskay I. 2018. Interaction between Different Pharmaceutical Excipients in Liquid Dosage Forms: Assessment of Cytotoxicity and Antimicrobial Activity. Molecules (Basel, Switzerland), 23(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071827>.
- Ngamcharungchit C, Chaimusik N, Panbangred W, Euanorasetr J, & Intra B. 2023. Bioactive Metabolites from Terrestrial and Marine Actinomycetes. 1–33.
- Omar A, & Nadworny P. 2017. Review: Antimicrobial efficacy validation using in vitro and in vivo testing methods. Advanced Drug Delivery Reviews, 112, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.09.003>.
- Omwenga EO, & Awuor SO. 2024. The Bacterial Biofilms: Formation, Impacts, and Possible Management Targets in the Healthcare System. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2024, 1542576. <https://doi.org/10.1155/cjid/1542576>.
- Parboteeah S, Jawaheer S, Bhowon MG, Laulloo SJ, & Dyal SD. 2023. Antibacterial properties and characterization of metabolite extracts of mangrove soil-associated bacteria from a subtropical island: Evaluation of their activity against common human pathogens and biofilms of clinical importance. The Microbe, 1, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2023.100013>.
- Permatahati DWIM, Rika P, Putri J, Pratiwi LUH, & Yanti D. Kandungan γ - 6(2), 89–93.
- Raghukumar S. 2017. Extreme Marine Environments. In Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi (pp. 219–263). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54304-8_12.
- Rather MA, Gupta K, & Mandal M. 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. Brazilian Journal of Microbiology, 52(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>.

- Razak AR, Tandah MR, Farmasi J, & Tadulako U. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Gel Ekstrak Daun Sereh (*Cymbopogon nardus* L. Rendle) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Penyebab Jerawat. 3(2), 143–149. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2017.v3.i2.8770>.
- Rommes H, van Saene R, & de la Cal MA. 2021. Inoculation and Culturing. In Selective Decontamination of the Digestive Tract (SDD): Current Guidelines (pp. 129–136). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65225-8_10.
- Sánchez O, Stefanni S, & Bhadury P. 2024. The deep-sea biodiversity and conservation collection. In Scientific reports, 14(1), 27559. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77742-7>.
- Sastri TK, Gupta VN, Chakraborty S, Madhusudhan S, Kumar H, Chand P, Jain V, Veeranna B, & Gowda DV. 2022. Novel Gels: An Emerging Approach for Delivering of Therapeutic Molecules and Recent Trends. Gels (Basel, Switzerland), 8(5). <https://doi.org/10.3390/gels8050316>.
- Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, & Aalinkel R. 2023. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. Microorganisms, 11(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>.
- Stroppel L, Schultz-Fademrecht T, Cebulla M, Blech M, Marhöfer RJ, Selzer PM, & Garidel P. 2023. Antimicrobial Preservatives for Protein and Peptide Formulations: An Overview. Pharmaceutics, 15(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020563>.
- Tangdilintin F, Stephanie, Achmad AA, Sulistiawati, Enggi CK, & Permana AD. 2025. Chapter 9 - In situ gel forming formulations for topical drug delivery. In A. J. Paredes, E. Larrañeta, G. Laverty, & R. F. Donnelly (Eds.), Hydrogels in Drug Delivery (pp. 307–349). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-22017-3.00001-9>.
- Theuretzbacher U. 2025. The global resistance problem and the clinical antibacterial pipeline. Nature Reviews Microbiology, 23(8), 491–508. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01169-8>.
- Topical K. 2020. Recent Approaches and Applications of Topical Gel as a Novel Drug Delivery. 2.
- Touaitia R, Mairi A, Ibrahim NA, Basher NS, Idres T, & Touati A. 2025. *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. Antibiotics, 14(5), 1–37. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050470>.
- Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, & Ribeiro VST. 2023. Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilms. Antibiotics (Basel, Switzerland), 12(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010087>.

- Vermassen A, Leroy S, Talon R, Provot C, Popowska M, & Desvaux M. 2019. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Frontiers in Microbiology*, 10, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00331>.
- Vicaria JM, Herrera-Márquez O, Serrano-Haro M, Vidal A, Jurado E, & Jiménez-Pérez JL. 2022. Optimization of surfactant formulations to stabilise proteases and amylases. *Chemical Engineering Science*, 260, 117858. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2022.117858>.
- Wardhani DA, & Susilowati A. 2023. Formulasi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Sediaan Gel Hand Sanitizer Berbahan Aktif Kitooligosakarida. 78–91. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v8i1.64231>.
- Wen Y, Qiang J, Zhou G, Zhang X, Wang L, & Shi Y. 2022. Characterization of redox and salinity-tolerant alkaline protease from *Bacillus halotolerans* strain DS5. *Frontiers in Microbiology*, 13, 935072. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.935072>.
- Xu F, Wang N, Li G, Guo W, Yang C, & Liu D. 2017. Establishment and Assessment of Mice Models of Type 2 Diabetes Mellitus. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 39(3), 324–329. <https://doi.org/10.3881/j.issn.1000-503X.2017.03.005>.
- Yampolsky M, Bachelet I, & Fuchs Y. 2024. Reproducible strategy for excisional skin-wound-healing studies in mice. *Nature Protocols*, 19(1), 184–206. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00899-4>.
- Zhou X, Chen Y, Ma X, Yu Y, Yu X, Chen X, & Suo H. 2022. Efficacy of *Bacillus coagulans* BC01 on loperamide hydrochloride-induced constipation model in Kunming mice. *Frontiers in Nutrition*, 9, 964257. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.964257>.

BAB VII

PEMBAHASAN UMUM

7.1 Potensi bakteri laut penghasil protease dari Pantai Losari, Makassar, sebagai sumber enzim

Eksplorasi enzim dari mikroorganisme laut ekstremofil telah menjadi fokus bioteknologi modern karena kondisi ekstrem seperti variasi salinitas, tekanan, suhu, dan radiasi UV mendorong evolusi enzim dengan sifat katalitik unik dan stabilitas tinggi untuk aplikasi industri (Gallo & Aulitto, 2024; Salas-Bruggink et al., 2024; Lauritano, 2023). Indonesia sebagai negara kepulauan terbesar dengan posisi strategis di segitiga terumbu karang memiliki keanekaragaman hayati laut yang luar biasa (Risjani et al., 2021), namun potensi mikroorganisme laut Indonesia sebagai sumber enzim industri masih minim tereksplorasi.

Perairan Pantai Losari di Makassar menawarkan ekosistem unik sebagai perairan urban dengan tekanan antropogenik tinggi yang diduga menciptakan tekanan selektif terhadap komunitas mikroba dengan adaptasi metabolik khusus (Anita et al., 2025). Protease sebagai enzim proteolitik memiliki aplikasi luas dalam industri pangan, farmasi, deterjen, tekstil, dan pengolahan limbah dengan pasar global yang terus berkembang (Apoorva et al., 2024; Matter et al., 2023). Permintaan akan protease dengan stabilitas termal tinggi, toleransi pH ekstrem, dan aktivitas dalam kondisi salinitas tinggi semakin meningkat, namun sumber enzim dengan kombinasi karakteristik tersebut masih terbatas (Arya et al., 2021; Yang et al., 2023). Meskipun penelitian bakteri laut penghasil protease telah dilakukan di berbagai belahan dunia, eksplorasi sistematis terhadap bakteri dari perairan pesisir Indonesia, khususnya ekosistem urban seperti Pantai Losari, masih sangat jarang. Studi terdahulu umumnya berfokus pada isolasi dan skrining aktivitas, namun belum mengintegrasikan analisis ekologi mikroba, karakterisasi biokimia komprehensif, dan identifikasi molekuler secara menyeluruh.

Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri laut penghasil protease dari sedimen dan air laut Pantai Losari, mengevaluasi aktivitas proteolitik dan karakteristik biokimia enzim yang dihasilkan, serta menganalisis keragaman genetik isolat melalui sekuensing gen 16S rRNA. Pendekatan multidisiplin yang mengintegrasikan ekologi mikroba, mikrobiologi, biokimia enzim, dan biologi molekuler diharapkan memberikan pemahaman menyeluruh tentang potensi bioteknologi bakteri laut lokal. Hasil penelitian ini diharapkan memperkaya database keragaman bakteri laut Indonesia, menghasilkan kandidat enzim komersial, dan mendukung agenda bioprospecting berkelanjutan untuk kemajuan bioteknologi nasional.

7.2 Keberagaman ekologi dan seleksi isolat penghasil protease

Strategi pengambilan sampel dari empat titik dengan variasi parameter fisiko-kimia (suhu 30-31°C dan pH 5-7) di perairan Pantai Losari merepresentasikan pendekatan bioprospecting yang komprehensif untuk menangkap keragaman komunitas bakteri laut (Anita et al., 2025). Desain sampling ini memungkinkan pemahaman tentang hubungan antara kondisi lingkungan dengan potensi enzimatik mikroba.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sedimen laut (MB-SL) merupakan sumber yang secara signifikan lebih kaya akan bakteri proteolitik (60% isolat positif) dibandingkan air laut (MB-WL, 20% isolat positif). Sedimen laut berfungsi sebagai reservoir nutrisi dan energi, mengakumulasi bahan organik kompleks termasuk protein yang menciptakan tekanan selektif menguntungkan bagi bakteri yang mampu mensekresikan protease ekstraseluler untuk mendegradasi protein makromolekul (Apoorva et al., 2024; Radisky, 2024). Kolom air yang relatif lebih oligotrofik cenderung dihuni oleh bakteri dengan strategi metabolik berbeda yang lebih bergantung pada nutrisi terlarut (Yin et al., 2024; Arya et al., 2021).

Dua isolat unggul yaitu MB-SL5 dan MB-SL6 menunjukkan indeks proteolitik tertinggi. Meskipun berasal dari genus berbeda, keduanya sama-sama unggul dalam aktivitas proteolitik, mengindikasikan konvergensi evolusioner dimana kemampuan proteolitik tinggi berkembang secara independen pada kelompok taksonomi berbeda dalam lingkungan yang sama (Naveed et al., 2021; Sheikh et al., 2024).

Mekanisme hidrolisis kasein oleh protease bakteri *S. algae* merupakan proses katalitik kompleks. Kasein sebagai fosfoprotein yang menyusun sekitar 80% protein susu mengalami hidrolisis melalui pengikatan substrat ke situs aktif enzim melalui interaksi non-kovalen (Tavano et al., 2018; Silva et al., 2018). Protease *S. algae* termasuk metaloprotease yang memerlukan ion logam seperti Zn^{2+} , Ca^{2+} , atau Mg^{2+} sebagai kofaktor yang mengkoordinasi molekul air di situs aktif untuk menghasilkan ion hidroksil yang menyerang ikatan peptida (Zambare et al., 2019; Amin et al., 2017). Protease ini termasuk endoprotease dengan aktivitas optimal pada pH 7-9 dan suhu 25-45°C dengan efisiensi katalitik mencapai 10^3 - 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ (Sinha & Khare, 2023).

Identifikasi molekuler menggunakan sekuensing gen 16S rRNA mengungkap identitas isolat sebagai *Shewanella algae* (MB-SL5) dan *Vibrio alginolyticus* (MB-SL6). *Shewanella algae* merupakan bakteri Gram-negatif dengan kemampuan respirasi anaerob yang fleksibel dan menghasilkan metaloprotease yang memerlukan ion logam untuk aktivitas optimal (Lemaire et al., 2020; Sharma et al., 2017). *Vibrio alginolyticus* merupakan bakteri halofilik yang menghasilkan serine protease atau metaloprotease dengan aktivitas optimal pada pH netral hingga sedikit alkali dan menunjukkan stabilitas terhadap surfaktan (Broberg et al., 2011; Sheikh et al., 2024).

Secara ekologis, *Shewanella* cenderung dominan di sedimen dan kondisi anaerob, sementara *Vibrio* lebih umum di kolom air dan permukaan sedimen aerob (Martín-Rodríguez, 2025). Secara konteks bioteknologi kesehatan, kedua bakteri

menawarkan keunggulan signifikan untuk mengatasi resistensi antimikroba. Protease dari kedua genus ini menunjukkan potensi sebagai agen terapeutik melawan MRSA melalui mekanisme degradasi protein biofilm dan faktor virulensi bakteri patogen (Lister et al., 2017; Nithya et al., 2021). Identifikasi kedua genus dari lokasi yang sama menunjukkan kekayaan keanekaragaman hayati mikroba perairan Indonesia dan potensinya sebagai sumber enzim terapeutik (Radjasa et al., 2020), serta membuka peluang eksplorasi senyawa antimikroba lain dari mikroba laut Indonesia (Datta et al., 2021; Zhang & Austin, 2023).

7.3 Kinetika produksi dan karakterisasi biokimia protease dari *Shewanella algae*

Analisis kinetika produksi protease dari isolat *S. algae* menunjukkan aktivitas spesifik protease mencapai puncak pada jam ke-48 inkubasi (0,458 U/mL) dengan nilai OD 0,82, bertepatan dengan fase pertumbuhan eksponensial menuju fase stasioner awal (Annamalai et al., 2014). Produksi protease yang optimal pada fase ini mengindikasikan bahwa sintesis enzim merupakan respons terhadap stres nutrisi dimana bakteri mengalihkan metabolisme dari sintesis biomassa ke produksi enzim hidrolitik untuk mengakses nutrisi dari degradasi protein kompleks (Ramnath et al., 2017; Devi et al., 2008). Pemahaman kinetika produksi ini penting dalam optimasi fermentasi skala industri untuk menentukan waktu pemanenan yang tepat guna memaksimalkan hasil enzim sekaligus meminimalkan biaya produksi (Sandhya et al., 2005).

Karakterisasi biokimia menunjukkan protease bekerja optimal pada pH 7 (0,2865 U/mL) dan suhu 37°C (0,2863 U/mL), mengonfirmasi sifatnya sebagai protease mesofilik (Vijayaraghavan & Vincent, 2014). Kejenuhan substrat terjadi pada konsentrasi kasein 1,0% (0,2386 U/mL). Hasil paling mencolok adalah efek aktivasi kuat dari ion logam, dimana ion Ba²⁺ meningkatkan aktivitas hingga 448,59%, Mg²⁺ hingga 299,87%, dan Co²⁺ hingga 264,57% pada konsentrasi 1 mM, sedangkan Ca²⁺ bersifat inhibitor pada konsentrasi 10 mM (76,83%) (Abusham et al., 2009). Pola aktivasi ini mengindikasikan bahwa protease termasuk kelas metalloprotease dimana ion logam berperan sebagai kofaktor esensial yang berpartisipasi langsung dalam katalisis dengan mempolarisasi molekul air atau menstabilkan intermediat tetrahedral dalam mekanisme hidrolisis peptida (Zambare et al., 2019; Barzkar et al., 2022).

Pemurnian dilakukan melalui tiga tahap: fraksinasi amonium sulfat menghasilkan fraksi F3 (40-60%) dengan aktivitas spesifik 0,901 U/mg, dialisis meningkatkan tingkat kemurnian menjadi 5,72 kali lipat dengan aktivitas spesifik 39,93 U/mg, dan kromatografi gel filtrasi Sephadex G-75 menghasilkan fraksi F12 dengan aktivitas spesifik tertinggi 207 U/mg dan peningkatan kemurnian 29,64 kali lipat. Analisis SDS-PAGE menunjukkan pita tunggal dominan dengan berat molekul 75 kDa, mengonfirmasi tingkat kemurnian tinggi protease yang diperoleh.

Profil biokimia menunjukkan bahwa protease dari *S. algae* memiliki karakteristik kompetitif untuk aplikasi industri yang mencakup produksi hidrolisat protein untuk suplemen nutrisi, pengolahan susu, dan formulasi deterjen cair non-alkali (Tavano et al., 2018). Sifat mesofilik dengan pH optimum netral menawarkan keuntungan ekonomi signifikan melalui pengurangan biaya pemanasan dan konservasi energi dalam proses skala besar (Razzaq et al., 2019). Integrasi data kinetika dan karakterisasi biokimia memberikan fondasi untuk rekayasa proses produksi yang optimal dan efisien sebagai kunci sukses dalam pengembangan produk enzim industri (Sinha & Khare, 2023);

7.4 Validasi keberhasilan pemurnian dan estimasi berat molekul protease

Tahap pemurnian dengan presipitasi ammonium sulfat dan dialisis berhasil mengisolasi enzim protease dengan efisiensi tinggi (Deng et al., 2019). Analisis SDS-PAGE fraksi F-12 menunjukkan satu pita protein tunggal dengan berat molekul sekitar 75 kDa (Mahto & Das, 2022). Pita tunggal yang tajam mengindikasikan penghilangan protein pengotor yang hampir sempurna tanpa degradasi protein (Kumar et al., 2020). Analisis densitometri digital mengkonfirmasi kemurnian lebih dari 95%, memenuhi persyaratan untuk aplikasi industri dan penelitian lanjutan (Annamalai et al., 2014). Tingkat kemurnian yang tinggi menjadi prasyarat penting untuk studi kinetika enzim yang akurat dan aplikasi spesifik di bidang farmasi (Razzaq et al., 2019).

Berat molekul 75 kDa berada dalam kisaran umum protease bakteri ekstraseluler seperti serine protease atau metalloprotease (Barzkar et al., 2021). Estimasi ini didukung kurva kalibrasi protein marker standar dengan koefisien determinasi $R^2 = 0,9846$ (Silva et al., 2018). Proses dialisis berhasil menghilangkan garam anorganik tanpa menyebabkan denaturasi enzim, yang ditunjukkan oleh terjaganya aktivitas enzim pasca dialisis (Gurung et al., 2020). Keberhasilan pemurnian ini membuka peluang untuk studi lanjutan seperti penentuan sekuens asam amino, analisis kristalografi struktur 3D, dan rekayasa protein (Sinha & Khare, 2023). Protokol pemurnian yang teroptimasi dapat diaplikasikan pada skala lebih besar dengan modifikasi minimal untuk keperluan komersialisasi (Tavano et al., 2018).

7.5. Konvergensi temuan dan peta jalan menuju aplikasi industri kesehatan

Konvergensi seluruh data yang diperoleh mulai dari karakterisasi ekologi, identifikasi bakteri, kinetika produksi, karakterisasi biokimia, hingga pemurnian telah berhasil mengungkap potensi terapi protease dari *Shewanella algae* (MB-SL 5) yang menunjukkan profil properti unik untuk berbagai aplikasi biomedis dengan aktivasi spesifik oleh ion logam tertentu, khususnya Ba^{2+} dan Mg^{2+} , yang membuka peluang modulasi aktivitas enzim dalam sistem biologis (Mahto & Das, 2022). Protease ini berpotensi dikembangkan sebagai agen fibrinolitik untuk terapi trombosis, agen debridemen untuk terapi luka kronis, dan komponen terapi enzim-targeted untuk kanker karena kemampuannya berfungsi optimal pada suhu fisiologis (37°C) dan pH

netral sesuai dengan kondisi dalam sistem sirkulasi manusia serta mampu mendegradasi protein mati dan matriks ekstraseluler tanpa merusak jaringan sehat (Barzkar et al., 2021; Datta et al., 2021).

Pengembangan menuju aplikasi klinis memerlukan validasi keamanan dan efikasi melalui serangkaian tahapan pre-klinis meliputi studi toksisitas *in vitro* dan *in vivo*, optimasi formulasi dalam sistem pembawa yang stabil, uji efikasi pada model hewan penyakit, serta studi farmakokinetik dan farmakodinamik untuk menentukan dosis dan regimen pemberian yang optimal (Gurung et al., 2020; Razzaq et al., 2019). Protease sebagai produk biologi baru memerlukan karakterisasi komprehensif sesuai persyaratan badan pengawas obat dengan proses produksi yang memenuhi standar Good Manufacturing Practice (GMP), sementara integrasi dengan teknologi drug delivery modern dan kombinasi dengan agen terapi lain dapat meningkatkan efikasi terapi sekaligus meminimalkan efek samping (Sinha & Khare, 2023; Tavano et al., 2018). Kolaborasi multidisiplin antara peneliti dasar, klinisi, dan ahli regulasi dengan pendekatan translasional yang terstruktur diperlukan untuk merealisasikan potensi penuh enzim ini, dan investasi dalam penelitian dan pengembangan lebih lanjut akan menentukan keberhasilan transformasi enzim ini menjadi modalitas terapi yang inovatif dan bermanfaat bagi pasien (Zhang & Austin, 2023; Okshevsky & Meyer, 2019).

7.6 Analisis *in silico* Interaksi molekuler dan identifikasi senyawa aktif protease sebagai agen Anti-MRSA

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan ancaman kesehatan global yang serius akibat resistensinya terhadap berbagai antibiotik konvensional, sehingga mendorong pengembangan strategi terapeutik baru melalui penapisan secara *in silico* menggunakan teknik molekuler docking untuk mengidentifikasi senyawa yang berpotensi menghambat fungsi protein-protein kunci MRSA (Vestergaard et al., 2019; Aslam et al., 2018). Penelitian ini berfokus pada tiga protein target MRSA yaitu 1MWR, 2IWD, dan 2IWC yang memainkan peran krusial dalam mekanisme seluler dan metabolisme bakteri (Xia et al., 2021), dengan menggunakan ligan Arginin, Lysine, Glutamic Acid, dan β -lactoglobulin yang merupakan produk hidrolisis dari enzim protease (Tavano et al., 2018). Hasil simulasi molekuler docking menunjukkan bahwa Lysine menampilkan performa terbaik dengan afinitasnya yang tinggi dan interaksi yang stabil, terutama pada protein 2IWD dan 2IWC, menempatkannya sebagai kandidat ligan penghambat yang paling prospektif melalui pembentukan ikatan hidrogen konvensional dan interaksi hidrofobik tanpa diiringi interaksi yang tidak menguntungkan (Pinzi & Rastelli, 2019).

Metode LC-MS/MS berhasil mengidentifikasi senyawa Congocidin atau Netropsin sebagai senyawa ke-108 dalam fraksi protease *Shewanella algae* dengan formula molekul $C_{18}H_{26}N_{10}O_3$ dan skor keakuratan identifikasi 96,35 (Mahto & Das, 2022). Netropsin merupakan antibiotik yang bekerja dengan berikatan pada alur minor struktur heliks ganda DNA bakteri dan menghambat proses transkripsi serta

replikasi (Dervan, 2001; Reddy et al., 2017). Studi molekular docking lanjutan menunjukkan bahwa Netropsin mampu berikatan dengan kuat dan spesifik pada situs aktif semua protein target MRSA, membentuk banyak ikatan hidrogen dengan jarak ikatan yang sangat pendek seperti 1,87 Å dengan ASN561 pada protein 1MWR dan 2,00 Å dengan TYR519 pada protein 1MWT (Kitchen et al., 2004), serta pola pengikatan kompleks dan multifaset dengan lebih dari sepuluh interaksi pada protein 2IWD yang didominasi ikatan hidrogen kuat dengan residu seperti LYS437 dan MET436 (Ferreira et al., 2015). Pendekatan *in silico* berhasil mengidentifikasi Lysine dan Netropsin sebagai kandidat senyawa anti-MRSA yang sangat potensial, memberikan landasan molekular yang kuat untuk pengembangan terapi baru sebagai agen penghambat protein esensial MRSA yang efektif mengatasi resistensi antibiotik (Datta et al., 2021; Sabe et al., 2021).

7.7 Evaluasi *in vitro*: aktivitas biologis fraksi protease *Shewanella algae* (antioksidan, dan antimikroba) terhadap MRSA

Penelitian ini mengevaluasi kemampuan fraksi protease dari *S.algae* sebagai agen antioksidan menggunakan metode DPPH terhadap tiga fraksi yaitu F8, F12, dan F14 (Sarmadi & Ismail, 2010). Hasil pengujian menunjukkan variasi kemampuan antioksidan yang signifikan, di mana Fraksi 12 mencatat nilai IC₅₀ terendah yaitu 56,59 µg/mL yang menunjukkan kapasitas antioksidan tertinggi, diikuti Fraksi 14 dengan nilai IC₅₀ 88,75 µg/mL, sementara Fraksi 8 menunjukkan aktivitas paling lemah dengan nilai IC₅₀ 147,26 µg/mL (Chakrabarti et al., 2018). Kemampuan antioksidan yang tinggi pada Fraksi 12 diduga berasal dari kandungan peptida bioaktif hasil hidrolisis protease yang dapat mendonasikan elektron atau atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas, sehingga menghentikan reaksi berantai oksidatif yang merusak sel dan jaringan serta mendukung proses penyembuhan luka dengan mengurangi peradangan (Elias et al., 2008; Harnedy & FitzGerald, 2012).

Uji antimikroba terhadap MRSA dilakukan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer dengan Fraksi 12 sebagai kandidat terbaik yang diuji pada rentang konsentrasi 6,25 hingga 100 µg/mL (Hudzicki, 2009). Hasilnya menunjukkan pola respons berbanding lurus dengan dosis, di mana pada konsentrasi rendah (6,25–25 µg/mL) zona hambat konstan pada 6,5 mm, kemudian meningkat signifikan pada konsentrasi 50 µg/mL menjadi 9,75 mm yang mengindikasikan MIC berada pada rentang 25–50 µg/mL, dan mencapai puncaknya pada konsentrasi 100 µg/mL dengan zona hambat 14,17 mm (Balouiri et al., 2016). Analisis komparatif menunjukkan bahwa meskipun konsentrasi Fraksi 12 (100 µg/mL) 500 kali lebih rendah daripada kloramfenikol (50.000 µg/mL), ia mampu menghasilkan zona hambat setara dengan 50,2% dari zona hambat kloramfenikol dengan efisiensi molekular sekitar 251 kali lebih tinggi, mengindikasikan potensi intrinsik yang sangat tinggi melalui mekanisme degradasi protein-protein vital pada dinding sel atau membran plasma MRSA (Mahto & Das, 2022; Barzkar et al., 2021). Kemampuan fraksi 12 mengatasi resistensi MRSA menunjukkan bahwa target dan mekanisme kerjanya berbeda dari antibiotik konvensional, sehingga tidak terpengaruh oleh mekanisme resistensi yang sudah ada, menjadikannya kandidat utama untuk

dikembangkan lebih lanjut dalam formulasi gel antimikroba topikal sebagai strategi terapeutik inovatif dan efektif untuk menangani infeksi MRSA yang resisten dengan manfaat tambahan sebagai antioksidan dan potensi penyembuh luka (Datta et al., 2021; Vestergaard et al., 2019)..

7.8. Analisis *in-vivo*: efektivitas gel protease Isolat *Shewanella algae* dalam penyembuhan luka terinfeksi MRSA

Penelitian ini berhasil membuktikan potensi gel protease bakteri laut sebagai terapi inovatif untuk infeksi MRSA, di mana gel protease konsentrasi 0,1% mencapai waktu penyembuhan tercepat (10,67 hari) dan mampu menyaingi efektivitas mupirocin 2% sebagai kontrol positif (Pastar et al., 2013; Jones et al., 2019).

Model infeksi MRSA yang dikembangkan menunjukkan konsistensi tinggi dengan terbentuknya eritema, edema, dan discharge purulen dalam 24 jam pasca inokulasi yang berhasil mereplikasi kondisi klinis infeksi kulit MRSA (Otto, 2018). Hasil penelitian mengungkap hubungan berbanding lurus dengan dosis yang tidak linear dan bersifat berfase ganda, di mana konsentrasi 0,1% menunjukkan efektivitas optimal sementara peningkatan konsentrasi justru menurunkan performa terapeutik (Calabrese & Baldwin, 2003).

Gel protease 0,5% membutuhkan waktu penyembuhan lebih lama (11,83 hari), dan konsentrasi 1% menunjukkan hasil terburuk dengan hanya 33,3% sampel sembuh total pada hari ke-14, mengindikasikan fenomena hormesis dalam farmakologi enzim yang membuktikan bahwa konsentrasi tinggi justru bersifat kontraproduktif dan dapat menghambat proses penyembuhan secara signifikan (Mattson, 2008). Pada konsentrasi 0,1%, protease bekerja melalui mekanisme debridemen enzimatik yang terkontrol dan selektif dengan membersihkan jaringan nekrotik dan biofilm MRSA tanpa merusak jaringan sehat, serta membebaskan faktor pertumbuhan terikat matriks seperti TGF- β dan VEGF yang memacu proliferasi fibroblast dan angiogenesis (Guo & DiPietro, 2010; Nussbaum et al., 2018).

Kelompok protease 0,1% menunjukkan laju penyembuhan tertinggi (0,91-1,0 mm/hari) pada fase proliferasi yang mengindikasikan konsentrasi ini optimal dalam mendukung pembentukan jaringan granulasi yang vaskular dan mempertahankan keseimbangan optimal antara metaloproteinase matriks (MMPs) dan inhibitornya (TIMPs) (Eming et al., 2017; Caley et al., 2015). Konsentrasi protease 1% menyebabkan gangguan signifikan melalui mekanisme toksisitas proteolitik di mana aktivitas enzim berlebihan merusak matriks ekstraseluler baru, faktor pertumbuhan, dan komponen seluler vital sehingga terjadi ketidakseimbangan destruktif antara sintesis dan degradasi matriks (McCarty & Percival, 2013). Degradasi berlebihan pada membran basal pembuluh darah dan faktor pro-angiogenik menghambat pembentukan jaringan granulasi yang vaskular, memperpanjang fase inflamasi, dan mengganggu proses re-epitelisasi di mana degradasi protein adhesif mengganggu migrasi dan kohesi keratinosit (Schultz et al., 2011; Raziyeve et al., 2021).

Keberhasilan formulasi gel topikal membuktikan bahwa pendekatan sistem penghantaran yang tepat merupakan kunci pemanfaatan molekul bioaktif kompleks

seperti enzim, di mana sifat rheologi gel yang memungkinkan adhesi optimal, pelepasan terkontrol, dan efek moisturizing turut mendukung proses penyembuhan (Boateng et al., 2015). Gel protease 0,1% menunjukkan profil keamanan yang baik selama periode aplikasi 14 hari tanpa tanda-tanda toksisitas sistemik maupun iritasi lokal signifikan, serta memberikan keuntungan ekonomis karena jumlah enzim yang diperlukan per unit formulasi lebih sedikit sehingga menekan biaya manufacturing tanpa mengorbankan efikasi (Gurung et al., 2020). Mekanisme kerja protease yang berbeda dari antibiotik konvensional melalui degradasi protein struktural dan virulensi bakteri mempersulit terjadinya resistensi, dan kombinasi antara aktivitas antimikroba, debridemen enzimatik, dan stimulasi regenerasi dalam satu molekul menjadikan protease agen terapeutik yang dapat menyederhanakan regimen perawatan luka (Mahto & Das, 2022; Barzkar et al., 2021). Data *in vivo* yang kuat dan menyeluruh ini merupakan langkah penting menuju pra-uji klinis dan memberikan dasar ilmiah kuat untuk mengajukan persetujuan uji lebih lanjut pada manusia, sementara gel protease 0,1% memiliki nilai proposisi kuat sebagai produk biologis inovatif yang efektif melawan patogen prioritas WHO dengan profil keamanan baik dan memberikan kontribusi penting dalam memahami interaksi antara enzim proteolitik eksogen dan proses biologis kompleks penyembuhan luka terinfeksi (Datta et al., 2021; Vestergaard et al., 2019).

7.9 Analisis mekanisme potensi protease *Shewanella algae* sebagai kandidat agen terapeutik alternatif untuk mengatasi infeksi MRSA

Protease bakteri laut yang diisolasi dari perairan Pantai Losari, Makassar, menunjukkan mekanisme dan potensi yang sangat kuat sebagai kandidat agen terapeutik alternatif untuk mengatasi infeksi MRSA (Vestergaard et al., 2019). Ancaman global MRSA yang resisten terhadap antibiotik konvensional seperti β -laktam akibat produksi PBP2a mendesak penemuan terapi dengan mekanisme kerja baru (Otto, 2018). Protease laut menawarkan solusi inovatif dengan mekanisme aksi multitarget yang unik, dimana enzim ini mampu mendegradasi berbagai komponen vital MRSA secara simultan, termasuk protein dinding sel, adhesin, faktor virulensi, dan matriks biofilm (Mahto & Das, 2022). Kemampuan menghancurkan biofilm merupakan keunggulan strategis, karena struktur pelindung inilah yang sering membuat MRSA kebal terhadap antibiotik dan sistem imun (Okshevsky & Meyer, 2019).

Secara *in vitro*, fraksi protease (F12) menunjukkan efektivitas sangat tinggi dengan aktivitas antimikroba bersifat dose-dependent dengan estimasi MHK pada rentang 25-50 $\mu\text{g/mL}$ terhadap MRSA (Balouiri et al., 2016). Efisiensi molekulernya sekitar 251 kali lebih tinggi daripada kloramfenikol, mengindikasikan potensi intrinsik yang sangat kuat melalui aktivitas proteolitik spesifik yang menargetkan protein-protein vital atau enzim-enzim kunci dalam sel MRSA, sebuah pendekatan yang tidak terpengaruh oleh mekanisme resistensi antibiotik konvensional (Mahto & Das, 2022; Barzkar et al., 2021).

Analisis *in silico* melalui molekular docking memperkuat landasan molekuler dari potensi ini, dimana senyawa seperti Lysine sebagai produk hidrolisis protease dan Netropsin yang teridentifikasi dalam fraksi protease menunjukkan afinitas pengikatan yang tinggi dan stabil terhadap protein-protein target esensial MRSA seperti 1MWR, 2IWD, dan 2IWC (Pinzi & Rastelli, 2019; Ferreira et al., 2015). Interaksi yang didominasi oleh ikatan hidrogen yang kuat dan spesifik ini mengindikasikan mekanisme penghambatan potensial terhadap proses seluler kunci bakteri dan membuka peluang untuk rekayasa senyawa berbasis struktur (Sabe et al., 2021).

Protease laut juga dilengkapi dengan aktivitas antioksidan yang signifikan, dimana fraksi F12 mencatat nilai IC_{50} sebesar 56,59 $\mu\text{g/mL}$ dalam uji DPPH, menunjukkan kapasitas kuat dalam menetralkan radikal bebas (Sarmadi & Ismail, 2010; Chakrabarti et al., 2018). Aktivitas ini sangat relevan dalam konteks infeksi dimana stres oksidatif sering menyertai dan memperburuk kerusakan jaringan, sehingga dengan mengurangi beban oksidatif, protease tidak hanya memerangi bakteri tetapi juga menciptakan lingkungan mikro yang kondusif untuk regenerasi dan penyembuhan jaringan (Elias et al., 2008).

Bukti *in vivo* semakin mengukuhkan potensi terapeutik, dimana formulasi gel protease konsentrasi 0,1% terbukti mampu mempercepat penyembuhan luka terinfeksi MRSA pada model hewan dengan waktu penyembuhan 10,67 hari yang bahkan sedikit lebih unggul dibandingkan mupirocin 2% sebagai kontrol positif (Pastar et al., 2013; Jones et al., 2019). Keberhasilan ini ditopang oleh mekanisme kerja multi-aspek: pertama, enzim berfungsi sebagai agen debridemen enzimatik yang selektif membersihkan jaringan nekrotik dan material purulen tanpa merusak jaringan sehat (Nussbaum et al., 2018); kedua, protease memodulasi lingkungan luka dengan melepaskan faktor pertumbuhan terikat matriks seperti TGF- β dan VEGF yang merangsang proliferasi fibroblas dan angiogenesis (Guo & DiPietro, 2010); ketiga, meregulasi keseimbangan dinamis antara metaloproteinase matriks (MMPs) dan inhibitorynya (TIMPs) yang krusial untuk remodeling matriks ekstraseluler (Caley et al., 2015; Eming et al., 2017).

Berdasarkan data konsentrasi optimal 0,1%, protease membantu menjaga keseimbangan ini sehingga mendukung deposisi kolagen yang teratur dengan laju penyembuhan tertinggi (0,91-1,0 mm/hari) (Schultz et al., 2011). Penelitian ini mengungkap fenomena hormesis dalam farmakologi enzim, dimana respons terapeutik tidak linier terhadap dosis dengan konsentrasi rendah (0,1%) menunjukkan efektivitas optimal, sementara peningkatan konsentrasi menjadi 0,5% dan 1% justru menurunkan performa terapeutik secara signifikan (Calabrese & Baldwin, 2003; Mattson, 2008). Pada konsentrasi 1%, aktivitas proteolitik berlebihan menjadi kontraproduktif karena merusak matriks ekstraseluler baru, faktor pertumbuhan, dan komponen seluler vital sehingga mengganggu keseimbangan antara sintesis dan degradasi matriks (McCarty & Percival, 2013; Raziyeve et al., 2021).

Perspektif keamanan dan formulasi, gel berbasis karbopol terbukti mampu memberikan lingkungan stabil bagi protease dengan kontak berkepanjangan pada area luka tanpa menimbulkan iritasi signifikan (Boateng et al., 2015). Gel protease

konsentrasi 0,1% menunjukkan profil keamanan yang baik selama periode aplikasi 14 hari tanpa tanda-tanda toksisitas sistemik (Gurung et al., 2020). Keunggulan strategis lainnya terletak pada potensi sinerginya dengan antibiotik konvensional, dimana kemampuan protease dalam mendegradasi biofilm dan melemahkan struktur sel bakteri dapat memfasilitasi penetrasi antibiotik sehingga memungkinkan penggunaan dosis antibiotik lebih rendah dan mengurangi risiko pengembangan resistensi lebih lanjut (Datta et al., 2021).

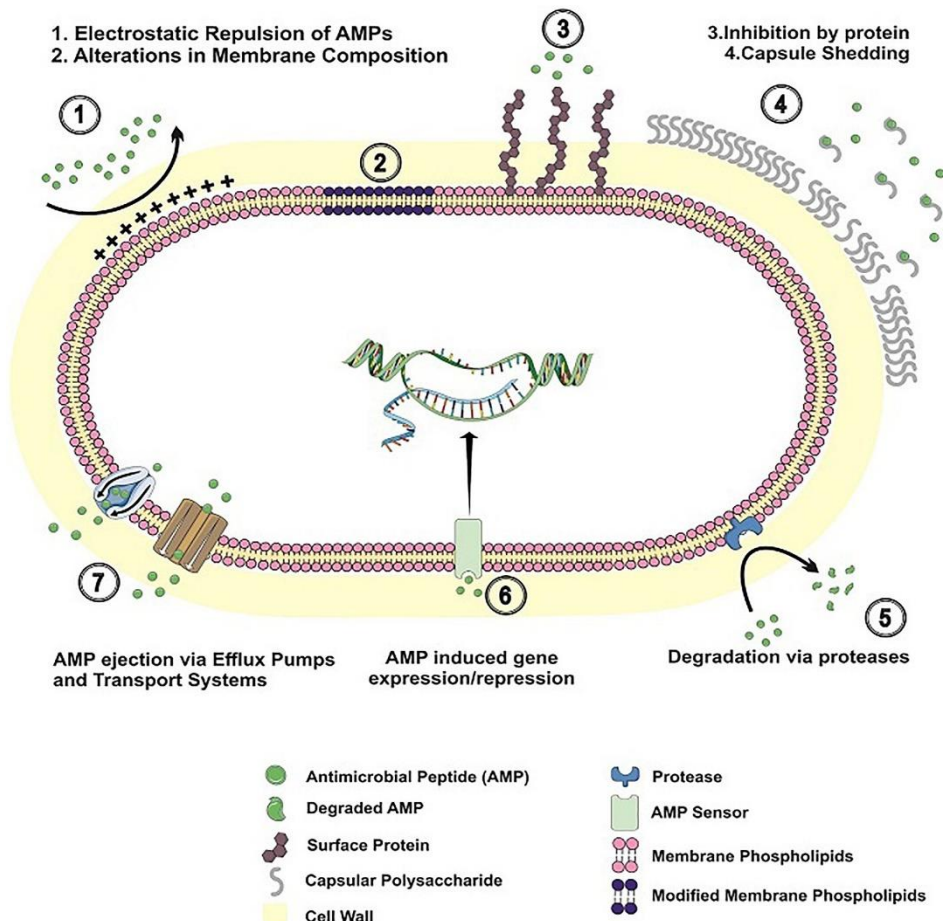
Secara ekonomi, penggunaan konsentrasi efektif yang rendah (0,1%) memberikan keuntungan biaya produksi signifikan karena jumlah enzim yang diperlukan per unit formulasi lebih sedikit, ditambah fakta bahwa bakteri penghasil enzim seperti *Shewanella* dan *Vibrio* relatif mudah dikarakterisasi dan dapat dikultur dengan efisien (Radjasa et al., 2020; Sharifah & Eguchi, 2018). Potensi aplikasinya tidak terbatas pada luka terinfeksi MRSA biasa, tetapi dapat dieksplorasi untuk jenis luka kompleks lainnya seperti ulkus diabetik dan luka bakar yang sering disertai dengan biofilm dan jaringan nekrotik yang sulit ditangani (Nussbaum et al., 2018).

Kompleksitas mekanisme resistensi bakteri terhadap Antimicrobial Peptides (AMPs) mencakup tujuh strategi pertahanan berbeda yang dikembangkan oleh bakteri patogen seperti MRSA (Vestergaard et al., 2019). Mekanisme-mekanisme ini meliputi repulsi elektrostatis melalui modifikasi muatan permukaan sel, alterasi komposisi membran fosfolipid, inhibisi oleh protein permukaan yang bertindak sebagai decoy molekuler, pelepasan kapsul polisakarida yang mengikat AMPs di lingkungan ekstraseluler, degradasi enzimatis oleh protease yang disekresikan bakteri, regulasi genetik melalui sistem sensor AMP yang menginduksi ekspresi gen resistensi, dan sistem efflux aktif yang mengeluarkan AMPs dari dalam sel (Otto, 2018; Aslam et al., 2018).

Berdasarkan analisis mekanisme kerja seperti pada **Gambar 7.1**, protease bakteri laut menawarkan pendekatan terapi yang komprehensif dan multidimensi dalam mengatasi infeksi MRSA. Awalnya, enzim ini menyerang struktur biofilm MRSA yang merupakan pertahanan fisik utama bakteri. Biofilm yang tersusun dari matriks polimerik ekstraseluler dipecah oleh aktivitas proteolitik, sehingga membuka akses ke dalam koloni bakteri yang sebelumnya terlindungi. Setelah biofilm terbuka, protease langsung menyerang multiple target secara simultan pada sel MRSA. Enzim ini mendegradasi protein dinding sel, mengganggu integritas struktural bakteri, dan sekaligus menetralkan faktor virulensi seperti adhesin dan toksin yang berperan dalam patogenesis infeksi.

Mekanisme multitarget ini merupakan keunggulan strategis protease karena mempersulit perkembangan resistensi bakteri. Berbeda dengan antibiotik konvensional yang biasanya hanya menekan satu jalur metabolik, protease bekerja pada beberapa sistem essential sekaligus, sehingga MRSA harus mengembangkan multiple mekanisme pertahanan secara bersamaan untuk dapat bertahan. Selain efek antimikroba langsung, protease juga melakukan debridemen enzimatis dengan membersihkan jaringan nekrotik dan material purulen yang menjadi tempat persembunyian bakteri. Proses pembersihan ini bersifat selektif di mana jaringan

sehat yang baru terbentuk tidak terpengaruh, berbeda dengan debridemen mekanik yang seringkali merusak jaringan granulasi yang mulai tumbuh.



Gambar 7.1 Ilustrasi protease bakteri laut menawarkan pendekatan terapi yang komprehensif dan multidimensi dalam mengatasi infeksi MRSA

Gambar 7.1 mengilustrasikan kompleksitas mekanisme resistensi bakteri terhadap Antimicrobial Peptides (AMPs), yang mencakup tujuh strategi pertahanan berbeda yang dikembangkan oleh bakteri patogen seperti MRSA (Vestergaard et al., 2019). Mekanisme-mekanisme ini meliputi repulsi elektrostatis melalui modifikasi muatan permukaan sel, alterasi komposisi membran fosfolipid, inhibisi oleh protein permukaan yang bertindak sebagai decoy molekuler, pelepasan kapsul polisakarida yang mengikat AMPs di lingkungan ekstraseluler, degradasi enzimatik oleh protease yang disekresikan bakteri, regulasi genetik melalui sistem sensor AMP yang menginduksi ekspresi gen resistensi, dan sistem efflux aktif yang mengeluarkan

AMPs dari dalam sel (Otto, 2018; Aslam et al., 2018). Kompleksitas pertahanan berlapis ini menjelaskan mengapa pendekatan antimikroba konvensional sering mengalami kegagalan terhadap patogen resisten seperti MRSA, dan menggarisbawahi kebutuhan mendesak akan strategi terapeutik yang inovatif dan multifaset (Datta et al., 2021).

Protease bakteri laut dari isolat *Shewanella algae* dan *Vibrio alginolyticus* menawarkan pendekatan terapi yang fundamental berbeda dan berpotensi mengatasi berbagai mekanisme resistensi tersebut secara simultan (Mahto & Das, 2022; Barzkar et al., 2021). Keunggulan utama protease sebagai agen antimikroba terletak pada mekanisme aksinya yang tidak bergantung pada interaksi elektrostatis dengan membran bakteri seperti halnya AMPs. Sementara AMPs konvensional mengandalkan muatan positif untuk berinteraksi dengan membran bakteri bermuatan negatif dan dapat dihambat oleh modifikasi muatan permukaan (mekanisme 1), protease bekerja melalui hidrolisis proteolitik spesifik terhadap protein target di permukaan sel atau lingkungan ekstraseluler (Barzkar et al., 2021). Demikian pula, alterasi komposisi membran fosfolipid (mekanisme 2) yang efektif menghambat insersi AMPs tidak mempengaruhi aktivitas protease karena target utamanya adalah protein struktural dan fungsional, bukan membran lipid itu sendiri (Otto, 2018). Karakteristik ini memberikan protease keunggulan inheren dalam mengatasi dua mekanisme resistensi primer yang paling umum pada bakteri Gram-positif seperti MRSA (Vestergaard et al., 2019).

Protease bakteri laut menunjukkan potensi luar biasa dalam mendegradasi protein permukaan sel yang berfungsi sebagai faktor virulensi MRSA, secara langsung mengatasi mekanisme 3 dalam ilustrasi (Mahto & Das, 2022). Protein permukaan MRSA seperti protein A yang menghambat fagositosis, protein pengikat fibronektin yang memfasilitasi adhesi ke jaringan host, dan berbagai adhesin yang memediasi kolonisasi, semuanya merupakan substrat potensial untuk aktivitas proteolitik (Otto, 2018). Degradasi protein-protein ini tidak hanya mengurangi virulensi bakteri tetapi juga mengekspos epitop yang sebelumnya tersembunyi, memfasilitasi pengikatan komplemen dan meningkatkan opsonisasi untuk fagositosis oleh sistem imun host (Eming et al., 2017). Lebih lanjut, beberapa protease juga menunjukkan aktivitas terhadap komponen protein dalam matriks kapsular atau enzim yang terlibat dalam biosintesis kapsul polisakarida, sehingga dapat mengatasi mekanisme 4 di mana pelepasan kapsul biasanya mengikat dan menetralkan agen antimikroba (Barzkar et al., 2021). Dengan mendisrupsi integritas kapsul, protease mengurangi lapisan pelindung fisik yang menghalangi akses sistem imun dan agen antimikroba lain ke sel bakteri (Okshevsky & Meyer, 2019).

Salah satu aspek paling menarik dari protease sebagai agen antimikroba adalah kemampuannya mengatasi resistensi yang dimediasi oleh protease bakteri itu sendiri (mekanisme 5) (Mahto & Das, 2022; Barzkar et al., 2021). Meskipun bakteri seperti MRSA memproduksi protease endogen untuk mendegradasi AMPs dan komponen sistem imun host, protease dari bakteri laut umumnya memiliki struktur tiga dimensi, mekanisme katalitik, dan spesifisitas substrat yang sangat berbeda dari protease yang diproduksi oleh patogen manusia (Silva et al., 2018).

Perbedaan struktural ini membuat protease bakteri laut tidak mudah dihambat oleh inhibitor protease alami yang diproduksi MRSA, dan dalam beberapa kasus, protease laut bahkan menunjukkan resistensi terhadap degradasi oleh protease lain atau memiliki aktivitas katalitik yang lebih kuat (Barzkar et al., 2021). Karakteristik unik protease dari *S. algae*, khususnya aktivasinya yang dramatis oleh ion Ba^{2+} dan Mg^{2+} (peningkatan aktivitas hingga lebih dari 300% dan 200%), memberikan dimensi tambahan untuk modulasi dan optimasi aktivitas enzim dalam konteks terapeutik (Zambare et al., 2019; Annamalai et al., 2014). Fleksibilitas ini memungkinkan penyesuaian aktivitas protease sesuai dengan kondisi spesifik situs infeksi dan dapat dimanfaatkan untuk mengembangkan sistem penghantaran yang responsif terhadap kondisi lingkungan mikro (Gurung et al., 2020).

Protease juga menawarkan strategi untuk mengatasi mekanisme resistensi yang dimediasi oleh regulasi genetik (Vestergaard et al., 2019). Sistem sensing dan respons adaptif bakteri terhadap AMPs melibatkan berbagai protein regulator, faktor transkripsi, dan komponen sistem two-component yang semuanya dapat menjadi target potensial untuk degradasi proteolitik (Otto, 2018). Dengan mendegradasi protein-protein regulator kunci, protease dapat mengganggu kemampuan bakteri untuk menginduksi ekspresi gen resistensi atau mereprogramkan metabolisme mereka sebagai respons terhadap stres antimikroba (Vestergaard et al., 2019). Lebih menarik lagi, protease dapat mengganggu sistem quorum sensing yang memediasi ekspresi gen virulensi dan resistensi yang terkoordinasi dalam populasi bakteri (Okshevsky & Meyer, 2019). Peptida signal autoinducer yang memediasi komunikasi sel-ke-sel dalam quorum sensing merupakan substrat yang sangat rentan terhadap degradasi proteolitik (Mahto & Das, 2022). Dengan menghidrolisis peptida signal ini, protease secara efektif "membungkam" komunikasi bakteri, menghambat ekspresi terkoordinat dari faktor virulensi, produksi biofilm, dan mekanisme resistensi adaptif yang memerlukan respon populasi yang tersinkronisasi (Okshevsky & Meyer, 2019).

Keunggulan strategis penting lainnya dari protease adalah bahwa mekanisme aksinya yang ekstraseluler membuatnya tidak terpengaruh oleh sistem efflux (Vestergaard et al., 2019). Pompa efflux multidrug yang diekspresikan oleh bakteri resisten seperti MRSA efektif mengeluarkan berbagai agen antimikroba yang telah masuk ke dalam sel, termasuk antibiotik dan AMPs yang memerlukan akumulasi intraseluler untuk aktivitas optimal (Aslam et al., 2018). Namun, protease bekerja dengan mendegradasi target di permukaan sel atau dalam lingkungan periseluler, tidak memerlukan internalisasi untuk efektivitasnya (Barzkar et al., 2021). Karakteristik ini menghilangkan salah satu mekanisme resistensi yang paling promiscuous dan sulit diatasi dalam terapi antimikroba modern (Vestergaard et al., 2019). Lebih jauh, dengan melemahkan struktur permukaan sel dan mengurangi virulensi bakteri, protease dapat meningkatkan efektivitas agen antimikroba lain yang digunakan dalam kombinasi, termasuk antibiotik yang mungkin sebagian dikeluarkan oleh pompa efflux namun tetap dapat menunjukkan aktivitas pada bakteri yang sudah terkompromi pertahanannya (Datta et al., 2021).

Kontribusi signifikan protease bakteri laut dalam mengatasi infeksi MRSA juga termanifestasi dalam kemampuannya mendisrupsi biofilm, suatu mode pertumbuhan bakteri yang sangat resisten terhadap hampir semua bentuk terapi antimikroba (Okshevsky & Meyer, 2019). Biofilm MRSA, yang sering terbentuk pada luka kronik, implan medis, dan kateter, dikarakterisasi oleh matriks ekstraseluler (EPS) yang kompleks yang terdiri dari polisakarida, DNA ekstraseluler, dan protein struktural yang membentuk jaringan pelindung di sekeliling komunitas bakteri (Otto, 2018). Protease dapat mendegradasi komponen protein dalam matriks ini, termasuk protein adhesin yang mengikat sel-sel bakteri bersama dan ke permukaan substrat, serta protein struktural yang memberikan integritas mekanik pada biofilm (Mahto & Das, 2022). Degradasi matriks ini tidak hanya melemahkan struktur biofilm tetapi juga meningkatkan penetrasi agen antimikroba lain ke dalam lapisan dalam biofilm yang biasanya terlindungi (Okshevsky & Meyer, 2019). Lebih lanjut, aktivitas proteolitik dapat memicu dispersi sel planktonik dari biofilm, dan sel-sel yang terdispersi ini jauh lebih rentan terhadap fagositosis oleh sistem imun dan aktivitas antimikroba dari antibiotik atau AMPs dibandingkan dengan sel-sel yang tertanam dalam matriks biofilm (Nussbaum et al., 2018).

Protease bakteri laut juga menunjukkan potensi untuk bekerja secara sinergis dengan sistem imun host melalui berbagai mekanisme (Eming et al., 2017). Degradasi protein permukaan dan kapsular MRSA mengekspos antigen dan pattern-associated molecular patterns (PAMPs) yang dapat dikenali oleh reseptor sistem imun innate, meningkatkan aktivasi komplemen dan fagositosis (Eming et al., 2017). Beberapa protease juga dapat memproses prekursor peptida antimikroba endogen host, seperti cathelicidin dan defensin, dari bentuk inaktif menjadi peptida antimikroba yang sepenuhnya aktif, secara efektif memperkuat respons antimikroba alami tubuh (Mahto & Das, 2022). Kemampuan untuk memodulasi respons imun ini sangat berharga dalam konteks infeksi MRSA, di mana keseimbangan antara eradikasi bakteri dan pencegahan kerusakan jaringan akibat inflamasi berlebihan sangat krusial (Raziyeva et al., 2021). Aktivitas proteolitik yang terkontrol dapat membantu resolusi inflamasi patologis sambil mempertahankan respons imun protektif, suatu keseimbangan yang sulit dicapai dengan terapi antimikroba konvensional (Eming et al., 2017).

Berdasarkan perspektif aplikasi terapeutik, protease bakteri laut menawarkan fleksibilitas yang luar biasa untuk berbagai modalitas pengobatan (Mahto & Das, 2022). Untuk infeksi kulit dan jaringan lunak yang merupakan manifestasi klinis paling umum dari infeksi MRSA komunitas, protease dapat diformulasikan sebagai gel, krim, atau hydrogel topikal yang dapat diaplikasikan langsung ke situs infeksi (Boateng et al., 2015). Formulasi topikal ini sangat sesuai untuk pengobatan luka kronik atau ulkus diabetik yang sering terinfeksi dengan biofilm MRSA yang sangat resisten (Nussbaum et al., 2018). Untuk infeksi sistemik atau respiratori, protease dapat dikembangkan sebagai terapi adjuvan dalam kombinasi dengan antibiotik standar seperti vankomisin, linezolid, atau daptomycin (Datta et al., 2021). Dalam skenario kombinasi ini, protease berfungsi sebagai pembuka jalan yang melemahkan pertahanan struktural MRSA, memfasilitasi penetrasi dan meningkatkan aktivitas

antibiotik (Datta et al., 2021). Strategi pretreatment dengan protease sebelum administrasi antibiotik telah menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam studi *in vitro*, dengan peningkatan signifikan dalam kerentanan bakteri terhadap antibiotik yang sebelumnya resisten (Mahto & Das, 2022). Untuk infeksi respiratori MRSA, termasuk pneumonia nosokomial dan kolonisasi pada pasien dengan *cystic fibrosis*, formulasi inhalasi protease dapat dikembangkan untuk penghantaran langsung ke saluran pernapasan, memaksimalkan konsentrasi lokal sambil meminimalkan paparan sistemik (Gurung et al., 2020).

Aplikasi pencegahan juga merupakan area yang sangat menjanjikan untuk protease bakteri laut (Okshevsky & Meyer, 2019). Imobilisasi protease pada permukaan kateter vaskular, kateter urin, implan ortopedi, atau perangkat medis lainnya dapat mencegah pembentukan biofilm MRSA yang merupakan penyebab utama infeksi terkait perangkat medis (Okshevsky & Meyer, 2019). Coating antimikroba berbasis protease yang melepaskan enzim secara berkelanjutan atau yang tetap aktif dalam keadaan terimobilisasi dapat secara signifikan mengurangi insiden infeksi nosokomial yang sangat mahal dan berbahaya ini (Boateng et al., 2015). Teknologi coating yang merespons kondisi lingkungan, misalnya yang mengaktifkan pelepasan protease hanya ketika terdeteksi kolonisasi bakteri awal, dapat mengoptimalkan efektivitas sambil meminimalkan paparan enzim yang tidak perlu (Gurung et al., 2020).

Meskipun potensi terapeutik protease bakteri laut sangat menjanjikan, beberapa tantangan kritis harus diatasi sebelum translasi klinis dapat terealisasi (Sinha & Khare, 2023). Karakterisasi mendalam tentang spesifisitas substrat protease sangat esensial untuk memastikan bahwa enzim tidak mendegradasi protein host yang penting untuk struktur jaringan, koagulasi, atau fungsi imun (Gurung et al., 2020). Evaluasi komprehensif tentang toksisitas potensial, baik lokal maupun sistemik, serta imunogenisitas yang dapat memicu respons antibodi yang menetralkan aktivitas enzim atau bahkan menyebabkan reaksi alergi, harus dilakukan dalam model praklinis yang relevan sebelum uji klinis pada manusia (Sinha & Khare, 2023). Stabilitas enzim selama penyimpanan dan dalam kondisi fisiologis juga merupakan pertimbangan kritis yang memerlukan optimasi formulasi yang cermat (Tavano et al., 2018). Pengembangan sistem penghantaran yang melindungi protease dari degradasi prematur oleh protease endogen atau kondisi pH ekstrem dalam saluran pencernaan, sambil memfasilitasi pelepasan terkontrol di situs target, merupakan tantangan rekayasa farmasi yang signifikan (Gurung et al., 2020).

Namun, karakteristik unik protease dari *S. algae*, khususnya modulasi aktivitasnya oleh ion logam, juga menawarkan peluang untuk pengembangan sistem kontrol aktivitas yang canggih (Zambare et al., 2019; Annamalai et al., 2014). Kemampuan untuk mengaktifkan atau mengurangi aktivitas enzim melalui manipulasi konsentrasi ion logam spesifik dapat dimanfaatkan untuk mengembangkan pro-enzyme atau zymogen yang hanya diaktivasi di situs infeksi dengan kondisi ionik tertentu, meningkatkan spesifisitas terapeutik dan mengurangi efek off-target (Tavano et al., 2018). Sistem penghantaran yang responsif terhadap biomarker infeksi, seperti pH asam yang sering dijumpai di jaringan yang terinflamasi atau

konsentrasi protease bakteri yang tinggi, dapat dikembangkan untuk mengaktivasi protease terapeutik secara spatio-temporal yang tepat (Gurung et al., 2020).

Secara keseluruhan, protease bakteri laut dari *Shewanella algae* dan *Vibrio alginolyticus* merepresentasikan kelas agen antimikroba yang fundamental baru dengan mekanisme aksi yang berbeda dari antimikroba konvensional (Mahto & Das, 2022; Barzkar et al., 2021). Kemampuannya untuk secara simultan mengatasi multiple mekanisme resistensi bakteri yang diilustrasikan dalam gambar, termasuk repulsi elektrostatis, alterasi membran, inhibisi oleh protein permukaan, pelepasan kapsul, degradasi enzimatis, regulasi genetik adaptif, dan sistem eflux, menjadikan protease ini sebagai kandidat yang sangat menarik untuk pengembangan terapi baru terhadap MRSA dan patogen resisten lainnya (Vestergaard et al., 2019). Potensi untuk bekerja sinergis dengan sistem imun host dan antibiotik yang ada, kemampuan mendisrupsi biofilm yang sangat resisten, dan fleksibilitas untuk berbagai modalitas aplikasi terapeutik semakin memperkuat nilai protease ini dalam arsenal melawan resistensi antimikroba (Datta et al., 2021; Okshevsky & Meyer, 2019). Dengan penelitian lanjutan yang fokus pada karakterisasi keamanan, optimasi formulasi, dan validasi efikasi dalam model praklinis dan uji klinis, protease bakteri laut memiliki potensi untuk menjadi solusi inovatif terhadap ancaman global resistensi antimikroba yang terus meningkat, khususnya dalam konteks infeksi MRSA yang semakin sulit diobati dengan terapi konvensional (Sinha & Khare, 2023; Zhang & Austin, 2023).

7.10 Daftar Pustaka

- Abusham RA, Rahman RNZRA, Salleh AB, & Basri M. 2009. Optimization of physical factors affecting the production of a thermo-stable, organic solvent-tolerant protease from a newly isolated halo-tolerant *Bacillus subtilis* strain Rand. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-20>.
- Amin M, Bolhassani A, Taghizadeh S, Memarnejadian A, Rostami S, & Memarnejadian A. 2017. Biochemical characterization of a novel marine cold-active protease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105(1), 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.041>.
- Anita A, Natsir H, Taba P, Ahyar A, Soekamto NH, Permatasari NU, Rauf W, Massi N, & Fatmawati A. 2025. Novel Hydrolytic Enzymes and Protein Modelling from Marine Sedimentary Bacteria Losari Coastal, Makassar, South Sulawesi, Indonesia. *Trends in Sciences*, 22(11), 10574. <https://doi.org/10.55493/5178.v22i11.10574>.
- Annamalai N, Rajeswari MV, Sahu SK, & Balasubramanian T. 2014. Purification and characterization of solvent-stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. *Process Biochemistry*, 49(6), 1012-1019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.007>.
- Apoorva OS, Shukla K, Khurana A, & Chaudhary N. 2024. Proteases: Role in Various Human Diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 25(16), 2083-2127. <https://doi.org/10.2174/0113892010316162240910103659>.
- Arya PS, Yagnik SM, Rajput KN, Panchal RR, & Raval VH. 2021. Understanding the Basis of Occurrence, Biosynthesis, and Implications of Thermostable Alkaline Proteases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(12), 4113-4150. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03701-x>.
- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat MKF, & Baloch Z. 2018. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645-1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
- Balouiri M, Sadiki M, & Ibnsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

- Barzkar N, Jahromi ST, Poorsaheli HB, & Vianello F. 2022. Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: Immense scope for pharmacology. *Marine Drugs*, 20(4), 464. <https://doi.org/10.3390/md20040464>.
- Barzkar N, Tamadoni Jahromi S, Poorsaheli HB, & Vianello F. 2021. Marine microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, biochemical properties and thrombolytic activity. *Marine Drugs*, 19(1), 46. <https://doi.org/10.3390/md19010046>.
- Boateng J, Burgos-Amador R, Okeke O, & Pawar H. 2015. Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.048>.
- Broberg CA, Calder TJ, & Orth K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection*, 13(12-13), 992-1001. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.013>.
- Calabrese EJ, & Baldwin LA. 2003. Hormesis: The dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, 175-197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223>
- Caley MP, Martins VL, & O'Toole EA. 2015. Metalloproteinases and wound healing. *Advances in Wound Care*, 4(4), 225-234. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>.
- Chakrabarti S, Guha S, & Majumder K. 2018. Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1738. <https://doi.org/10.3390/nu10111738>.
- Chen YJ, Leung PM, Wood JL, Bay SK, Hugenholtz P, Kessler AJ, Shelley G, Waite DW, Franks AE, Cook PLM, & Greening C. 2021. Metabolic flexibility allows bacterial habitat generalists to become dominant in a frequently disturbed ecosystem. *The ISME Journal*, 15(10), 2986-3004. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00988-w>.
- Cui Y, Jiang L, Huan Y, Geng F, Shi Y, & Li X. 2021. Preparation and characterization of casein hydrolysates with different molecular weight profiles obtained by controlled enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 341, 128230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128230>.
- Datta P, Gupta V, Kundu M, & Chowdhury G. 2021. Exploiting marine-derived bioactive compounds for combating antibiotic resistance. *Frontiers in Marine Science*, 8, 735798. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.735798>.

- Deng Y, van der Veer F, Sforza S, Gruppen H, & Wierenga PA. 2019. Towards predicting protein hydrolysis by bovine trypsin. *Process Biochemistry*, 65, 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.008>.
- Dervan PB. 2001. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9(9), 2215-2235. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00262-0).
- Devi MK, Banu AR, Gnanadoss GR, Pradeep BV, & Kannabiran K. 2008. Purification and characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 1(7), 1-6. <https://doi.org/10.17485/ijst/2008/v1i7.10>
- Elias RJ, Kellerby SS, & Decker EA. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>.
- Eming SA, Wynn TA, & Martin P. 2017. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*, 356(6342), 1026-1030. <https://doi.org/10.1126/science.aam7928>
- Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, & Andricopulo AD. 2015. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384-13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- Ghosh S, Kar P, Chakrabarti S, Pradhan S, Mondal KC, & Ghosh K. 2023. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* and its biocontrol using bacteriophages. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 3(4), 552-570. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00178-z>.
- Guo S, & DiPietro LA. 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>.
- Gurung N, Ray S, Bose S, & Rai V. 2020. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2020, 2913925. <https://doi.org/10.1155/2020/2913925>.
- Inomura K, Deutsch C, Jahn O, Dutkiewicz S, & Follows MJ. 2022. Global patterns in marine organic matter stoichiometry driven by phytoplankton ecophysiology. *Nature Geoscience*, 15(12), 1034-1040. <https://doi.org/10.1038/s41561-022-01066-2>.

- Jones RE, Foster DS, & Longaker MT. 2019. Management of chronic wounds—2018. JAMA, 320(14), 1481-1482. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.12426>.
- Khiari Z, Cacciatore F, Mudge E, & Pietrasik Z. 2021. Optimization of the enzymatic hydrolysis of beef and pork trimmings using Alcalase and Flavourzyme. Food Science & Nutrition, 9(5), 2424-2432. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2204>.
- Kotb E, Alabdall AH, Alsayed MA, Alghamdi AI, Alkhaldi E, AbdulAzeez S, & Borgio JF. 2023. Isolation, Screening, and Identification of Alkaline Protease-Producing Bacteria and Application of the Most Potent Enzyme from *Bacillus* sp. Mar64. Fermentation, 9(7), 637. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070637>.
- Lemaire ON, Méjean V, & Iobbi-Nivol C. 2020. The *Shewanella* genus: ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems. FEMS Microbiology Reviews, 44(2), 155-170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz031>.
- Mahto KU, & Das S. 2022. Marine bacterial proteases: Recent developments, promising features, and biomedical applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 194(4), 1595-1618. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03773-z>.
- Martín-Rodríguez AJ. 2025. *Shewanella algae*. Trends in Microbiology, 33(8), 920-921. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.02.011>.
- Mattson MP. 2008. Hormesis defined. Ageing Research Reviews, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>.
- McCarty SM, & Percival SL. 2013. Proteases and delayed wound healing. Advances in Wound Care, 2(8), 438-447. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0370>.
- Naveed M, Nadeem F, Mehmood T, Bilal M, Anwar Z, & Amjad F. 2021. Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. Catalysis Letters, 151(2), 307-323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.
- Nithya C, Gnanalakshmi B, & Pandian SK. 2021. Assessment and characterization of biofilm-forming bacteria from various ecological niches. Brazilian Journal of Microbiology, 52(2), 735-746. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00452-w>.
- Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nussgart M, & Cartwright D. 2018. An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. Value in Health, 21(1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.ival.2017.07.007>.

- Okshevsky M, & Meyer RL. 2019. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance, and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 341-352. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.841639>.
- Otto M. 2018. *Staphylococcal* infections: Mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 64, 175-188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>.
- Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, & Tomic-Canic M. 2013. Epithelialization in wound healing: A comprehensive review. *Advances in Wound Care*, 3(7), 445-464. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>.
- Pinzi L, & Rastelli G. 2019. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- Radisky ES. 2024. Extracellular proteolysis in cancer: Proteases, substrates, and mechanisms in tumor progression and metastasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 300(6), 107347. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107347>.
- Radjasa OK, Martens T, Grossart HP, Brinkhoff T, Sabdono A, & Simon M. 2020. Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with the coral *Acropora* sp. *Journal of Biological Sciences*, 7(2), 239-246. <https://doi.org/10.3923/jbs.2007.239.246>.
- Ramnath L, Sithole B, & Govinden R. 2017. Classification of bacterial proteases. In: Sharma R, & Dua Y (Eds.), *Bacillus and Agrobiotechnology* (pp. 145-158). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_8.
- Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, Rebello S, & Pandey A. 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16-30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.
- Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, & Saparov A. 2021. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 11(5), 700. <https://doi.org/10.3390/biom11050700>.
- Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, & Ashraf M. 2019. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.

- Sabe VT, Ntombela T, Jhamba LA, Maguire GEM, Govender T, Naicker T, & Kruger HG. 2021. Current trends in computer-aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113705. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113705>.
- Salamone M, Nicosia A, Ghersi G, & Tagliavia M. 2019. *Vibrio* Proteases for Biomedical Applications: Modulating the Proteolytic Secretome of *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* for Improved Enzyme Production. *Microorganisms*, 7(10), 387. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100387>.
- Salehi M. 2024. Evaluating the industrial potential of naturally occurring proteases: A focus on kinetic and thermodynamic parameters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127782>.
- Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, & Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>.
- Sarmadi BH, & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>.
- Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, & Herman IM. 2011. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair and Regeneration*, 19(2), 134-148. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00673.x>.
- Seibold E, & Berger W. 2017. Sources and Composition of Marine Sediments. In: *The Sea Floor: An Introduction to Marine Geology* (pp. 45-61). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51412-3_4.
- Sharma KM, Kumar R, Panwar S, & Kumar A. 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>.
- Sharifah EN, & Eguchi M. 2018. The phytoplankton *Nannochloropsis oculata* enhances the ability of *Roseobacter clade* bacteria to inhibit the growth of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *PLOS ONE*, 13(1), e0190531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190531>.

- Sheikh HI, Alhamadin NII, Liew HJ, Fadhlin A, Wahid MEA, Musa N, & Jalal KCA. 2024. Virulence Factors of the Zoonotic Pathogen *Vibrio alginolyticus*: A Review and Bibliometric Analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 60(3), 514-531. <https://doi.org/10.1134/S0003683823602822>.
- Silva JC, Carvalho LM, Oliveira MC, Maugeri-Filho F, & Hernandez-Macedo ML. 2018. Characterization of a versatile protease from a marine bacterium *Bacillus* sp. APCMST-RS7: A potential degrader of marine biofilm. *Biofouling*, 34(10), 1124-1137. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1544246>.
- Sinha R, & Khare SK. 2023. Microbial proteases: Recent advances and applications. *Process Biochemistry*, 125, 282-294. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.12.028>.
- Stal LJ, Bolhuis H, & Cretoiu MS. 2019. Phototrophic marine benthic microbiomes: the ecophysiology of these biological entities. *Environmental Microbiology*, 21(5), 1529-1551. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14494>.
- Tavano OL, Berenguer-Murcia A, Secundo F, & Fernandez-Lafuente R. 2018. Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 412-436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>.
- Vestergaard M, Frees D, & Ingmer H. 2019. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiology Spectrum*, 7(2), GPP3-0057-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018>.
- Vijayaraghavan P, & Vincent SGP. 2014. A low-cost fermentation medium for potential alkaline protease production by *Halomonas* sp. PV1 uses statistical approach. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52(10), 1036-1040.
- Vijayaraghavan P, & Vincent SGP. 2020. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresol green dye. *Journal of Biochemical Technology*, 5(2), 590-594.
- Weithoff G, Lorke A, & Walz N. 2000. Effects of water-column mixing on bacteria, phytoplankton, and rotifers under different levels of herbivory in a shallow eutrophic lake. *Oecologia*, 125(1), 91-100. <https://doi.org/10.1007/PL00008896>.
- Yang Z, Huang Z, Wu Q, Tang X, & Huang Z. 2023. Cold-Adapted Proteases: An Efficient and Energy-Saving Biocatalyst. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8532. <https://doi.org/10.3390/ijms24108532>.

- Yin Q, He K, Collins G, De Vrieze J, & Wu G. 2024. Microbial strategies driving low-concentration substrate degradation for sustainable remediation solutions. *Npj Clean Water*, 7(1), 52. <https://doi.org/10.1038/s41545-024-00348-z>
- Yu K, Huang Z, Xiao Y, & Wang D. 2022. *Shewanella* infection in humans: Epidemiology, clinical features, and pathogenicity. *Virulence*, 13(1), 1515-1532. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2117831>.
- Zago V, Veschetti L, Patuzzo C, Malerba G, & Lleo MM. 2020. *Shewanella algae* and *Vibrio spp.* Strains isolated in Italian aquaculture farms are reservoirs of antibiotic-resistant genes that may constitute a risk to human health. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111057. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111057>.
- Zambare V, Nilegaonkar S, & Kanekar P. 2019. Production of an alkaline protease by *Bacillus cereus* MCM B-326 and its application as a dehairing agent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(10), 2289-2296. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0692-4>.
- Zhang L, & Austin B. 2023. Marine microbial enzymes: Sources, production, and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1025258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1025258>.

BAB VIII

KESIMPULAN DAN SARAN

8.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, pengamatan, dan analisis data yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Karakteristik bakteri laut dari Pantai Losari dengan aktivitas proteolitik tertinggi telah berhasil dianalisis. Diperoleh isolat bakteri laut penghasil protease tertinggi, yaitu *Shewanella algae* (MB-SL.5) berdasarkan analisis molekuler sekuens 16S rRNA. Isolat *Shewanella algae* dipilih sebagai sumber protease untuk tahap penelitian selanjutnya
2. Karakterisasi sifat biokimia dan pemurnian protease dari *Shewanella algae* menunjukkan bahwa enzim ini memiliki kondisi optimum pada pH 7,0, suhu 37°C, dan konsentrasi substrat 1%. Protease ini diaktifkan oleh ion logam Mg^{2+} , Ba^{2+} , dan Co^{2+} yang mengindikasikan klasifikasinya sebagai metalloprotease. Pemurnian dilakukan melalui fraksinasi amonium sulfat pada tingkat kejenuhan F3, dialisis, dan filtrasi gel menggunakan matriks Sephadex G75. Proses pemurnian menghasilkan enzim dengan tingkat kemurnian tinggi (>95%) dan estimasi berat molekul 75 kDa.
3. Mekanisme kerja protease terhadap MRSA melalui pendekatan *in silico* berhasil dianalisis melalui molekular docking. Senyawa Netropsin (Congocidin) yang terdeteksi dalam fraksi protease menunjukkan afinitas pengikatan yang sangat kuat dan stabil terhadap protein target kunci MRSA (1MWR, 1MWT, 2IWC, 2IWD). Interaksi yang didominasi oleh ikatan hidrogen dan hidrofobik mengungkap potensinya sebagai inhibitor yang menargetkan proses esensial bagi kelangsungan hidup MRSA.
4. Aktivitas anti-MRSA protease secara *in vitro* telah terevaluasi dan membuktikan bahwa fraksi 12 memiliki aktivitas antimikroba yang kuat dan spesifik terhadap MRSA. Fraksi ini menunjukkan nilai MIC pada rentang 0.025–0.05 mg/mL dengan efisiensi molekuler yang sangat tinggi ($\approx 251\times$ lebih efisien dibandingkan kloramfenikol). Fraksi ini juga memiliki aktivitas antioksidan pendukung (IC_{50} 56,59 $\mu\text{g/mL}$) yang menciptakan profil bioaktivitas ganda menguntungkan untuk aplikasi terapeutik.
5. Efektivitas protease sebagai agen anti-MRSA secara *in vivo* telah teruji pada model mencit yang diinfeksi MRSA. Formulasi gel protease dengan konsentrasi optimal 0,1% mencapai waktu penyembuhan tercepat (10,67 hari) dan menunjukkan aktivitas setara atau bahkan sedikit lebih efektif dibandingkan mupirocin 2% sebagai kontrol positif. Hasil ini juga mengungkap fenomena konsentrasi rendah memberikan efek terapeutik optimal, sedangkan konsentrasi tinggi (1%) bersifat kontraproduktif bagi penyembuhan luka.
6. Mekanisme potensi protease dari *Shewanella algae* sebagai kandidat agen terapeutik alternatif untuk mengatasi infeksi MRSA bersifat multitarget dan komprehensif. Mekanisme tersebut meliputi: (1) degradasi biofilm dan

komponen sel MRSA melalui aktivitas proteolitik; (2) inhibisi protein target vital melalui senyawa aktif seperti Netropsin; (3) debridemen enzimatis selektif pada jaringan nekrotik; (4) modulasi lingkungan luka dengan pelepasan faktor pertumbuhan; (5) dukungan penyembuhan melalui aktivitas antioksidan. Kombinasi unik antara aktivitas antimikroba langsung, antivirulensi, dan proregeneratif yang dikemas dalam satu formulasi menawarkan paradigma baru yang efektif dan berkelanjutan dalam menghadapi tantangan resistensi antibiotik global. Protease ini menjadi kandidat terapeutik alternatif yang sangat menjanjikan untuk mengatasi infeksi MRSA.

8.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dan kendala yang dihadapi, beberapa saran yang dapat direkomendasikan untuk penelitian lanjutan adalah sebagai berikut:

1. **Penyediaan Fasilitas dan Instrumen Penelitian**

Fasilitas dan instrumen yang memadai untuk produksi skala besar, sistem kromatografi otomatis, dan peralatan analisis molekuler misalnya SDS-PAGE/PCR perlu disediakan untuk mendukung penelitian lanjutan yang lebih komprehensif dan efisien.

2. **Pelatihan Teknis Penggunaan Instrumen**

Pelatihan teknis bagi peneliti dalam penggunaan instrumen analisis lanjutan perlu dilakukan untuk memaksimalkan pemanfaatan fasilitas laboratorium yang tersedia dan meningkatkan kualitas hasil penelitian.

3. **Manajemen dan Pemeliharaan Fasilitas Laboratorium.**

Sistem manajemen dan pemeliharaan fasilitas laboratorium yang baik perlu diterapkan untuk memastikan instrumen berfungsi optimal dan mendukung keberlangsungan penelitian

DAFTAR PUSTAKA

- Abebe AA, & Birhanu AG. 2023. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: Molecular mechanisms underlying drug resistance development, novel strategies to combat infection. *Drug Resistance*, 16(11), 7641–7662. <https://doi.org/10.2147/IDR.S428103>.
- Agamah FE, Mazdanu GK, Hassan R, Bope CD, Thomford NE, Ghansah A, & Chimusa ER. 2020. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Briefings in Bioinformatics*, 21(5), 1663–1675. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz103>.
- Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezech EM, Ofoke IH, Ogbu CO, Ugwuja EI, & Aja PM. 2023. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in disease management. *Scientific Reports*, 13(1), 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>.
- Akbar Fitri, Himayanti, Rahman FF, Basnawi C, Hasrul N, & Sugianto I. 2022. Potential extract of Red algae (*Euchema spinosum*) on wound healing: literature review. *Makassar Dental Journal*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:254850623>.
- Akbar I. 2022. Literature Review: Pemanfaatan sumber daya kelautan untuk Sustainable Development Goals (SDGs). *Jurnal Sains Edukatika Indonesia (JSEI)*, 4(1), 17–22.
- Al Aboghaubar M, Alaidaroos B, Al-Hejin A, Bataweel N, & Hassoubah S. 2025. Antimicrobial activity of some bacteria isolated from a marine sponge in the Neom region, Saudi Arabia. *BMC Microbiology*, 25(1), 584. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04249-0>.
- Ali Alghamdi B, Al-Johani I, Al-Shamrani JM, Musamed Alshamrani H, Al-Otaibi BG, Almazmomi K, & Yusnoraini Yusof N. 2023. Antimicrobial resistance in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(4), 103604. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103604>.
- Alikhani MS, Nazari M, & Hatamkhani S. 2025. Enhancing antibiotic therapy through comprehensive pharmacokinetic/pharmacodynamic principles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1521091. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1521091>.
- Alipkina S, Kornienko E, Nalobin D, & Osmolovskiy A. 2021. Acute Toxicity, Immunotoxicity, and Allergenicity of Protease Complex Obtained from Micromycete *Sarocladium strictum*. *Pharmaceutics*, 13(10), 1660. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101660>.
- Alves A, & Kijjoa A. 2020. Marine-Derived Compounds with Potential Use as Cosmeceuticals and Nutricosmetics. *Molecules*, 25(5), 2536. <https://doi.org/10.3390/molecules25051223>.
- Ameen F, Alnadhari S, & Al-homaidan AA. 2021. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>.

- Ansari A, Zohra RR, Tarar OM, Qader SAU, & Aman A. 2018. Screening, purification, and characterization of thermostable, protease-resistant Bacteriocin active against *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *BMC Microbiology*, 18(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1337-y>.
- Anteneh YS, Yang Q, & Brown MH. 2021. Antimicrobial Activities of Marine Sponge-Associated Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e0123321. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01233-21>.
- Ashaolu TJ, Malik T, Soni R, Prieto MA, & Jafari SM. 2025. Extremophilic Microorganisms as a Source of Emerging Enzymes for the Food Industry: A Review. *Food Science and Nutrition*, 13(1), e4540. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4540>.
- Atre R, Sharma R, Obukhov AG, Saqib U, Umar S, Darwhekar GN, & Baig MS. 2024. An improved mouse model of sepsis based on intraperitoneal injections of the enriched culture of cecum slurry. *Life Sciences*, 345, 122584. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122584>.
- Balouiri M, Sadiki M, & Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barnsley KK, & Ondrechen MJ. 2022. Enzyme active sites: Identification and prediction of function using computational chemistry. *Current Opinion in Structural Biology*, 74, 102384. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102384>
- Barzkar N. 2020. Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072>.
- Barzkar N, Sukhikh S, & Babich O. 2023. Study of marine microorganism metabolites: new resources for bioactive natural products. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1285902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285902>.
- Belay WY, Getachew M, Tegegne BA, Teffera ZH, Dagne A, Zeleke TK, Abebe RB, Gedif AA, Fenta A, Yirdaw G, Tilahun A, & Aschale Y. 2024. Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1444781. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1444781>.
- Beygmoradi A, & Homaei A. 2017. Marine microbes are a valuable resource for brand-new industrial biocatalysts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 131–152. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.013>.
- Bibi F, Yasir M, Al-Sofyani A, Naseer MI, & Azhar EI. 2020. Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.002>.
- Bowman L, Motamed R, Lee P, Aleem K, Berawala AS, Hayden KL, Bzik DJ, & Chattopadhyay D. 2020. Optimum pH in coupled enzyme assays. *BioTechniques*, 69(5), 327–330. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0126>.

- Brdová D, Ruml T, & Viktorová J. 2024. Mechanism of Staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 77, 101147. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2024.101147>.
- Brogan AP, & Rudner DZ. 2023. Regulation of peptidoglycan hydrolases: localization, abundance, and activity. *Current Opinion in Microbiology*, 72, 102279. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102279>.
- Cantonati M, Poikane S, Pringle CM, Stevens LE, Turak E, Heino J, Richardson JS, Bolpagni R, Borrini A, Cid N, Tvrtlíková M, Galassi DMP, Hájek M, Hawes I, Levkov Z, Naselli-Flores L, Saber AA, Cicco MDi, Fiasca B, & Znachor P. 2020. Characteristics, Main Impacts, and Stewardship of Natural and Artificial Freshwater Environments. *Water*, 12(1), 260. <https://doi.org/10.3390/w12010260>.
- Chen H, Zhang J, He Y, Lv Z, Liang Z, Chen J, Li P, Liu J, Yang H, Tao A, & Liu X. 2022. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. *Toxins*, 14(7), 464. <https://doi.org/10.3390/toxins14070464>.
- Chen J, Gu Z, Lai L, & Pei J. 2023. In silico protein function prediction: the rise of machine learning-based approaches. *Medical Review*, 3(6), 487–510. <https://doi.org/10.1515/mr-2023-0038>.
- Cheng TH, Ismail N, Kamaruding N, Saidin J, & Danish-Daniel M. 2020. Industrial enzymes-producing marine bacteria from marine resources. *Biotechnology Reports*, 27, e00482. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00482>.
- Corinaldesi C. 2015. New perspectives in benthic deep-sea microbial ecology. *Frontiers in Marine Science*, 2, 17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00017>.
- Culp E, & Wright GD. 2017. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 366–377. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.138>.
- Ćwilichowska N, Świdarska KW, Dobrzyń A, Drag M, & Poręba M. 2022. Diagnostic and therapeutic potential of protease inhibition. *Molecular Aspects of Medicine*, 88, 101144. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101144>.
- Czerwi D. 2021. Guidelines for a Morphometric Analysis of Prokaryotic and Eukaryotic Cells by Scanning Electron Microscopy. *Cells*, 10(9), 2483. <https://doi.org/10.3390/cells10092483>.
- Dalmaso GZL, Ferreira D, & Vermelho AB. 2015. Marine extremophiles as a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1925–1965. <https://doi.org/10.3390/md13041925>.
- Oliveira Santos JV, Costa Júnior SD, de Souza JB, Coriolano DL, Silva WRC, Alves MHME, & Cavalcanti IMF. 2022. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. *Current Microbiology*, 79(6), 175. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02875-9>.
- Fanelli A, & Sullivan ML. 2023. Tools for protein structure prediction and for molecular docking applied to enzyme active site analysis: A case study using a BAHD hydroxycinnamoyltransferase. *Methods in Enzymology*, 683, 41–79. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.10.004>.

- Fergestad ME, Stamsås GA, Morales Angeles D, Salehian Z, Wasteson Y, & Kjos M. 2020. Penicillin-binding protein PBP2a provides variable levels of protection toward different β -laktams in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Microbiology Open*, 9(8), e1057. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1057>.
- Filippova TA, Masamrekh RA, Khudoklinova YY, Shumyantseva VV, & Kuzikov AV. 2024. The multifaceted role of proteases and modern analytical methods for the investigation of their catalytic activity. *Biochimie*, 222, 169–194. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.03.006>.
- Gaurav A, Bakht P, Saini M, Pandey S, & Pathania R. 2023. Role of bacterial pompa efflux (pompa efflux (efflux pump))s in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel pompa efflux (pompa efflux (efflux pump)) inhibitors. *Microbiology*, 169(5), 001333. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001333>.
- Ghattavi S, & Homaei A. 2023. Marine enzymes: Classification and application in various industries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 230, 123136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123136>.
- Ghazi IM, & Cawley MJ. 2021. The science of pharmacokinetics: an overview and applications. In Remington (Twenty-third Edition), 207–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820007-0.00011-8>.
- Girma A. 2025. *Staphylococcus aureus*: Current perspectives on molecular pathogenesis and virulence. *Infection and Drug Resistance*, 18, 215–234. <https://doi.org/10.2147/IDR.S493308>.
- Glassman PM, & Muzykantov VR. 2019. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drug Delivery Systems. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), 570–580. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.257113>.
- Golding CG, Lamboo LL, Beniac DR, & Booth TF. 2016. The scanning electron microscope in microbiology and the diagnosis of infectious diseases. *Scientific Reports*, 6, 26516. <https://doi.org/10.1038/srep26516>.
- Grari O, Ezrari S, El Ydanouzi I, Benaissa E, Ben Lahlou Y, Lahmer M, Saddari A, Elouennass M, & Maleb A. 2025. A comprehensive review on biofilm-associated infections: Mechanisms, diagnostic challenges, and innovative therapeutic strategies. *The Microbe*, 8, 100436. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100436>.
- Hamid B, Bashir Z, Yatoo AM, Mohiddin F, Majeed N, Bansal M, Pocza P, Almalki WH, Sayyed RZ, Shati AA, & Alfaifi MY. 2022. Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—A Review. *Molecules*, 27(18), 5885. <https://doi.org/10.3390/molecules27185885>.
- Han R, Feng XQ, Vollmer W, Stoodley P, & Chen J. 2023. Deciphering the adaptation of bacterial cell wall mechanical integrity and turgor to different chemical or mechanical environments. *Journal of Colloid and Interface Science*, 640, 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.02.100>.
- Hartung T, Villoutreix B, Debré HR, & Marshall L. 2024. The (misleading) role of animal models in drug development. *Frontiers in Drug Discovery*, 4, 1355044. <https://doi.org/10.3389/fddsv.2024.1355044>.

- Hasanpour AH, Sepidarkish M, Mollalo A, Ardekani A, Almukhtar M, Mechaal A, Hosseini SR, Bayani M, Javanian M, & Rostami A. 2023. The global prevalence of *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* colonization in residents of elderly care centers: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 12(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01210-6>.
- Hassanzadeh S, Ganjloo S, Pourmand MR, Mashhadi R, & Ghazvini K. 2020. Epidemiology of pompa efflux (pompa efflux (efflux pump)) genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*: A systematic review. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103850. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103850>.
- Hassoun A, Linden PK, & Friedman B. 2017. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations: review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care*, 21(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1801-3>.
- Hickman DL, Johnson J, Vemulapalli TH, Crisler JR, & Shepherd R. 2017. Commonly Used Animal Models. In *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, 117–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4>.
- Hossain TJ. 2024. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>.
- Ishikawa F, Homma M, Tanabe G, & Uchihashi T. 2024. Protein degradation by a component of the chaperonin-linked protease ClpP. *Genes to Cells*, 29(9), 695–709. <https://doi.org/10.1111/gtc.13141>.
- Jain A, Jain R, & Jain S. 2020. Enzyme Assay: Qualitative and Quantitative. In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*, 39–51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_17.
- Jankoski PR, Correa APF, Berdanelli A, & Motta ASDA. 2021. Biological activity of bacteria isolated from wildland sediments collected from a conservation unit in the southern region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93(3), e20191269. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191269>.
- Jo J, Price-Whelan A, & Dietrich LEP. 2022. Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 593–607. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00692-2>.
- Jubeh B, Breijyeh Z, & Karaman R. 2020. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming. *Molecules*, 25(12), 2888. <https://doi.org/10.3390/molecules25122888>.
- Balenahalli Narasingappa R, & Vishnu Vyas G. 2024. Unveiling mechanisms of antimicrobial peptide: Actions beyond the membrane disruption. *Heliyon*, 10(19), e38079. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38079>.
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, & Thurnheer T. 2020. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>.

- Kaushik A, Kest H, Sood M, Steussy BW, Thieman C, & Gupta S. 2024. Biofilm-Producing *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections in Humans: Clinical Implications and Management. *Pathogens*, 13(1), 76. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010076>.
- Kochhar N, Kavya IK, Shrivastava S, Ghosh A, Rawat VS, Sodhi KK, & Kumar M. 2022. Perspectives on the microorganisms of extreme environments and their applications. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100134. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100134>.
- Kong EF, Johnson JK, & Jabra-Rizk MA. 2016. Community-Associated *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005837. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005837>.
- Kumar S, & Kumar S. 2019. Molecular Docking: A Structure-Based Approach for Drug Repurposing. In *In Silico Drug Design*, 161–189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00006-7>.
- Kumar Y, Singh H, & Patel CN. 2020. In silico prediction of potential inhibitors for the main protease of SARS-CoV-2 using molecular docking and dynamics simulation-based repurposing. *Journal of Infection and Public Health*, 13(9), 1210–1223. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.016>.
- Lee YJ. 2025. The Role of Bacterial Proteases from the Microbiome in Human Disease. *Cellular Microbiology*, 2025, 8860329. <https://doi.org/10.1155/cmi/8860329>.
- Lim D, & Strynadka NCJ. 2002. Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*, 9(11), 870–876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>.
- Liu A, Garrett S, Hong W, & Zhang J. 2024. *Staphylococcus aureus* Infections and Human Intestinal Microbiota. *Pathogens*, 13(4), 276. <https://doi.org/10.3390/pathogens13040276>.
- Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, & Shirliff ME. 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 101, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.028>.
- Maddiboyina B, Roy H, Ramaiah M, Sarvesh CN, Kosuru SH, Nakkala RK, & Nayak BS. 2023. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: Novel treatment approach breakthroughs. *Bulletin of the National Research Centre*, 47(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01072-3>.
- Marshall NC, Finlay BB, & Overall CM. 2017. Sharpening Host Defenses during Infection: Proteases Cut to the Chase. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(4), S161–S171. <https://doi.org/10.1074/mcp.O116.066456>.
- Martínez GM, Pire C, & Martínez-Espinosa RM. 2022. Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100136. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100136>.

- Martinez MN, Mochel JP, & Toutain PL. 2025. Evolving value and validity of animal models in veterinary therapeutic research: Impact of scientific progress. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 210, 107111. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107111>.
- Maruthiah T, Immanuel G, & Palavesam A. 2017. Purification and Characterization of Halophilic Organic Solvent-Tolerant Protease from Marine *Bacillus* sp. APCMST-RS7 and Its Antioxidant Potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(1), 207–216. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0603-0>.
- Metra BM, Guglielmo FF, Halegoua-DeMarzio DL, Civan JM, & Mitchell DG. 2022. Beyond the Liver Function Tests: A Radiologist's Guide to the Liver Blood Tests. *Radiographics*, 42(1), 125–142. <https://doi.org/10.1148/rq.210137>.
- Mougi A. 2024. pH Adaptation stabilizes bacterial communities. *Npj Biodiversity*, 3(1), 32. <https://doi.org/10.1038/s44185-024-00063-5>.
- Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, & Nandi SK. 2022. Role of animal models in biomedical research: a review. *Laboratory Animal Research*, 38(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s42826-022-00128-1>.
- Ngema SS, Khumalo SH, Ojo MC, Pooe OJ, Malilehe TS, Basson AK, & Madoroba E. 2023. Evaluation of Antimicrobial Activity by Marine *Nocardiopsis dassonvillei* against Foodborne *Listeria monocytogenes* and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 11(10), 2539. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102539>.
- Nguyen H, Nguyen H, Nguyen P, Luu AN, Cantu DC, & Nguyen T. 2025. Identifying representative sequences of protein families using submodular optimization. *Scientific Reports*, 15(1), 1069. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-85165-1>.
- Norouzi H, Danesh A, Mohseni M, & Rabbani Khorasgani M. 2018. Marine Actinomycetes with Probiotic Potential and Bioactivity against Multidrug-resistant Bacteria. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 7(1), 44–52. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.1.44>.
- Noskova Y, Nedashkovskaya O, & Balabanova L. 2025. Production, Purification, and Biochemical Characterization of a Novel ATP-Dependent Caseinolytic Protease from the Marine Bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296. *Microorganisms*, 13(2), 307. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020307>.
- O'Neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
- Padhi AK, Janežič M, & Zhang KYJ. 2022. Molecular dynamics simulations: Principles, methods, and applications in protein conformational dynamics. In *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods*, 439–454. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90264-9.00026-X>.

- Pardo-Esté C, Cortés J, Castro-Severyn J, Pérez V, Henriquez-Aedo K, Cuadros F, Yañez C, Cuadros-Orellana S, Dorador C, Molina V, Eissler Y, Paquis P, Jeffrey WH, Pozo P, Pérez PA, & Hengst MB. 2024. Secondary metabolites with antimicrobial activity produced by thermophilic bacteria from a high-altitude hydrothermal system. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1477458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1477458>.
- Perera T, Sanjeewa KKA, & Herath KHIN. 2025. Promoting marine specialized bioactive metabolites against inflammation. In *Marine Specialized (Secondary) Metabolites and their Diverse Applications*, 173–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-29843-1.00007-0>.
- Pinzi L, & Rastelli G. 2019. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- Rachanamol RS, Lipton A, & Thankamani V. 2015. Molecular characterization and bioactivity profile of the tropical sponge-associated bacterium *Shewanella algae* VCDB. *Helgoland Marine Research*, 69(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s10152-014-0386-3>.
- Ramírez-Larrota JS, & Eckhard U. 2022. An Introduction to Bacterial Biofilms and Their Proteases and Their Roles in Host Infection and Immune Evasion. *Biomolecules*, 12(2), 306. <https://doi.org/10.3390/biom12020306>.
- Rampone S, Pagliarulo C, Marena C, Orsillo A, Iannaccone M, Trionfo C, Sateriale D, & Paolucci M. 2021. In silico analysis of the antimicrobial activity of phytochemicals: towards a technological breakthrough. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 200, 105820. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2020.105820>.
- Rao TE, Imchen M, & Kumavath R. 2017. Marine Enzymes: Production and Applications for Human Health. In *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications*, Part III, 149–163. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.006>.
- Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, & Elghonaimy AM. 2015. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal, and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research*, 175, 34 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002>
- Rasquel-Oliveira FS, Ribeiro JM, Martelossi-Cebinelli G, Costa FB, Nakazato G, Casagrande R, & Verri WA. 2025. *Staphylococcus aureus* in Inflammation and Pain: Update on Pathologic Mechanisms. *Pathogens*, 14(2), 185. <https://doi.org/10.3390/pathogens14020185>.
- Ratnikov BI, Cieplak P, Remacle AG, Nguyen E, & Smith JW. 2021. Quantitative profiling of protease specificity. *PLoS Computational Biology*, 17(2), e1008101. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008101>.
- Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, & Ashraf M. 2019. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.
- Riziotis IG, & Thornton JM. 2022. Capturing the geometry, function, and evolution of enzymes with 3D templates. *Protein Science*, 31(7), e4363. <https://doi.org/10.1002/pro.4363>.

- Rodríguez-Melcón C, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Carballo J, & Capita R. 2022. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>.
- Romsuk J, Yasumoto S, Seki H, Fukushima EO, & Muranaka T. 2022. Identification of key amino acid residues toward improving the catalytic activity and substrate specificity of plant-derived cytochrome P450 monooxygenases CYP716A subfamily enzyme for triterpenoid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 955650. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.955650>.
- Rosado PC, Marques MM, & Justino GC. 2025. Targeting MRSA penicillin-binding protein 2a: structural insights, allosteric mechanisms, and the potential of adjuvant inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 239, 117048. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.117048>.
- Salehi M. 2024. Evaluating the industrial potential of naturally occurring proteases: A focus on kinetic and thermodynamic parameters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127782>.
- Santos JD, Vitorino I, Reyes F, Vicente F, & Lage OM. 2020. From ocean to medicine: Pharmaceutical applications of metabolites from marine bacteria. *Antibiotics*, 9(8), 455. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080455>.
- Santos LHS, Ferreira RS, & Caffarena ER. 2019. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Methods in Molecular Biology*, 2053, 13–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2.
- Sathe G, & Sapkota GP. 2023. Proteomic approaches advancing targeted protein degradation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 44(11), 786–801. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.08.007>.
- Sati H, Carrara E, Savoldi A, Hansen P, Garlasco J, Campagnaro E, Boccia S, Castillo-Polo JA, Magrini E, Garcia-Vello P, Wool E, Gigante V, Duffy E, Cassini A, Huttner B, Pardo PR, Naghavi M, Mirzayev F, Zignol M, & Umubyeyi Nyaruhirira A. 2025. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 25(9), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(25\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00118-5).
- Saubenova M, Rapoport A, & Yermekbay Z. 2025. Antimicrobial Peptides, Their Production, and Potential in the Fight Against Antibiotic-Resistant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1518577. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1518577>.
- Shaari SA, & Bakar NAA. 2023. MRSA: Rates, trends, and infection prevention & control practices. *International Journal of Infectious Diseases*, 134, S22. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.07.023>.

- Shalaby MAW, Dokla EME, Serya RAT, & Abouzid KAM. 2020. Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199, 112312. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112312>.
- Sharif S, & Yadav AK. 2025. Bacterial biofilm and its role in antibiotic resistance. *The Microbe*, 7, 100356. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100356>.
- Sharma N, Sharma N, Sharma S, Sharma P, & Devi B. 2023. Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms. In *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, 47–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00003-9>.
- Shoaib M, Aqib AI, Muzammil I, Majeed N, Bhutta ZA, Kulyar MFEA, Fatima M, Zaheer CNF, Muneer A, Murtaza M, Kashif M, Shafqat F, & Pu W. 2022. MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1067284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067284>.
- Shree P, Kant C, Kaur K, Niranjane J, & Kumar D. 2023. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance to antibiotics. *Medicine in Microecology*, 16, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2023.100084>.
- Solanki P, Putatunda C, Kumar A, Bhatia R, & Walia A. 2021. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, 11(10), 428. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>.
- Srinivasan R, Kannappan A, Shi C, & Lin X. 2021. Marine Bacterial Secondary Metabolites: A Treasure House for Structurally Unique and Effective Antimicrobial Compounds. *Marine Drugs*, 19(10), 530. <https://doi.org/10.3390/md19100530>.
- Stewart MP, Langer R, & Jensen KF. 2018. Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts. *Chemical Reviews*, 118(16), 7409–7531. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00678>.
- Sun R, Wu D, Chen P, & Zheng P. 2024. Cutting-edge computational approaches in enzyme design and activity enhancement. *Biochemical Engineering Journal*, 212, 109510. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109510>.
- Tripathi A, & Bankaitis VA. 2017. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. *Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications*, 2(1). <https://doi.org/10.16966/2575-0305.106>.
- Tripathi A, & Misra K. 2017. Molecular Docking: A structure-based drug design approach. *JSM Chemistry*, 5(3), 1042–1047.
- Tsouklidis N, Kumar R, Heindl SE, Soni R, & Khan S. 2020. Understanding the Fight Against Resistance: Hospital-Acquired *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* vs. Community-Acquired *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Cureus*, 12(6), e8867. <https://doi.org/10.7759/cureus.8867>.
- Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, Dhama K, Ripon MKH, Gajdács M, Sahibzada MUK, Hossain MJ, & Koirala N. 2021. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.

- Uehara Y. 2022. Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). *Antibiotics*, 11(1), 86. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010086>.
- Uruén C, Chopo-Escuín G, Tommassen J, Mainar-Jaime RC, & Arenas J. 2021. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics*, 10(1), 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>.
- Venkataswamy GD, Harmsen D, D'Haese A, & Cornelissen ER. 2023. Membrane integrity monitoring on laboratory scale: Impact of test cell-induced damage on membrane selectivity. *Journal of Membrane Science*, 669, 121281. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2022.121281>.
- Wang S, Zhao Y, Breslawec AP, Liang T, Deng Z, Kuperman LL, & Yu Q. 2023. Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 63. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>.
- Wang Y, Zhang H, Zhong H, & Xue Z. 2021. Protein domain identification methods and online resources. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1145–1153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.041>.
- Wong F, & Amir A. 2019. Mechanics and Dynamics of Bacterial Cell Lysis. *Biophysical Journal*, 116(12), 2378–2389. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.04.040>.
- Xu S, Tan P, Tang Q, Wang T, Ding Y, Fu H, Zhang Y, Zhou C, Song M, Tang Q, Sun Z, & Ma X. 2023. Enhancing the stability of antimicrobial peptides: From design strategies to applications. *Chemical Engineering Journal*, 475, 145923. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145923>.
- Yadav AK, Espaillat A, & Cava F. 2018. Bacterial Strategies to Preserve Cell Wall Integrity Against Environmental Threats. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2064. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02064>.
- Youn C, Archer NK, & Miller LS. 2020. Research Techniques Made Simple: Mouse Bacterial Skin Infection Models for Immunity Research. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(8), 1488-1497.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.04.012>.
- Zhang J, Conly J, McClure J, Wu K, Petri B, Barber D, Elsayed S, Armstrong G, & Zhang K. 2021. A Murine Skin Infection Model Capable of Differentiating the Dermatopathology of Community-Associated MRSA Strain USA300 from Other MRSA Strains. *Microorganisms*, 9(2), 287. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020287>.
- Zhao A, Sun J, & Liu Y. 2023. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1137947. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil sekuensing dan penyelarasan sekuens isolat MB-SL 5

>5256025_A_63F

CTTGCTTTTGAGANANGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATTTGCCCA
 TTTGTGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGG
 GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTGATGGATAAGCCCAGGTGGGATTAG
 CTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
 ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG
 AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGGTGTAAAGTTA
 ATACCTTACATCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGG
 AACCGCATTTCGAACTGGCAAAGTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCC
 CCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAC
 ACTGGGCTCTCAAGCTAACGCATTAGATAGACCGCCTGGGTAGTACGGGCGCAAG
 GGTAAGACTTCAAATGAATTGGAGGGGGGGCGCGGC

>5256026_A_1387R

CTGATCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATC
 CGGACTACGACCAGCTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTCGCAACCCTCT
 GTACTGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTG
 ACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAAAGTTCCCGG
 CATTACCCGCTGGCAAGTAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
 ACATTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCG
 AAGGCACTGATGTATCTCTAACAAATTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCT
 TCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
 TTCATTTGAGTTTTAACTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAATGCGTT
 AGCTTGAGAGCCCAGTGTTCAAGACACCAAACCTCCGAGTAGACATCGTTTACGGC
 GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTGAGCG
 TCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACG
 CATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTTTGCCAG
 TTCGAAATGCGGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAACAAAC
 CGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAAACGCTCGCACCCCTCCGTAT
 TACCGCGGTGCTGCGCACGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCACA
 GATGTAAGGTATTAACCTTACACCCTTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCG
 AAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCCATTGTGCAA
 TATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTCAATCCAGTGTG
 GCTGATCATCCTCTCAANCCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTTACCTC
 ACCTACTAACTAATCCACCTGGGCTTATCCATCAGGGCAAGGCCCGAAGGTCCC
 CTGCTTTCCCCCGAAGGG

>Consensus

CTTGCTTTTGGAGANANGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATTTGCCCA
 TTTGTGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTWCGGGG
 GGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCSCTGATGGATAAGCCCAGGTGGGATTA
 GYTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTYTGAGAG
 GATGATCAGCCACACTGGGAYTGAGACACGGCCCAGACTCYTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT
 GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGGTGTAAAGT
 AATACCTTACATCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGG
 AACCGCATTTCGAACTGGCAAAGTACAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
 CCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
 ATACCTGGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGMA
 CACTGGGCTCTCAAGCTAACGCATTARRTAGACCGCCTGGGKAGTACGGSCGCAA
 GGKTAARACTTCAAATGAATTGRMGGGGGCCSGCRCARGCGGTGGAGCATGTGG
 TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATTTGTT
 AGAGATACATCAGTGCCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGC
 AGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCT
 TACTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACTTTAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGG
 AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACA
 CGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCC
 CATAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG
 AATCGCTAGTAATCGTGATCAG

Hasil Blast menunjukkan isolat MB-SL 5 memiliki kemiripan 97.82% dengan *S. algae*

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title: Nucleotide Sequence
 RID: [P6FAWA63014](#) Search expires on 01-12 13:04 pm [Download All](#)
 Program: BLASTN [Citation](#)
 Database: rRNA_typestrains/16S_ribosomal_RNA [See details](#)
 Query ID: lcl|Query_471337
 Description: None
 Molecule type: dna
 Query Length: 1280
 Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
[Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to
[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions **Graphic Summary** **Alignments** **Taxonomy**

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

☐ select all 1 sequences selected

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Shewanella algae strain DW01 16S ribosomal RNA, partial sequence	Shewanella...	2246	2246	100%	0.0	97.82%	1495	NR_137770.1
☐	Shewanella algae strain DW01 16S ribosomal RNA, partial sequence	Shewanella...	2246	2246	100%	0.0	97.82%	1420	NR_044134.1

***Shewanella algae* strain DW01 16S ribosomal RNA, partial sequence**

NCBI Reference Sequence: NR_117770.1

[FASTA Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS NR_117770 1495 bp rRNA linear BCT 12-MAR-2019
 DEFINITION *Shewanella algae* strain DW01 16S ribosomal RNA, partial sequence.
 ACCESSION NR_117770
 VERSION NR_117770.1
 DBLINK Project: [33175](#)
 BioProject: [PRJNA33175](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE *Shewanella algae*
 ORGANISM [Shewanella algae](#)
 Bacteria; Pseudomonadati; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria;
 Alteromonadales; Shewanellaceae; Shewanella.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1495)
 AUTHORS Verma,P., Patole,M.S. and Shouche,Y.S.
 TITLE Molecular phylogeny of *Shewanella* and its species
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1495)
 CONSRTM NCBI RefSeq Targeted Loci Project
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-APR-2014) National Center for Biotechnology
 Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA
 REFERENCE 3 (bases 1 to 1495)
 AUTHORS Verma,P., Patole,M.S. and Shouche,Y.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-MAR-2010) Molecular Biology Unit, National
 Centre for Cell Science, Ganeshkhind Road, Pune, Maharashtra 411007,
 India
 COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The
 reference sequence is identical to HM016086:1-1495.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1495
 /organism="*Shewanella algae*"
 /mol_type="rRNA"
 /strain="DW01"
 /type_material="type strain of *Shewanella haliotis*"
 /db_xref="taxon:[38313](#)"
[rRNA](#) <1..>1495
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 atccagagat tgcatggct cagattgaac gctggcggca ggcctaacac atgcaagtcg
 61 agcggtaaca ttcaaaagc ttgctttga agatgacgag cggcggacgg gtgagtaatg
 121 cctgggaatt tgcccattg tgggggataa cagttggaaa cgactgctaa taccgcatac
 181 gccctacggg ggaaagcagg ggaccttcgg gccttgcgct gatggataag cccaggtggg
 241 attagctagt aggtgaggta aaggctcacc taggcgacga tccctagctg gtctgagagg
 301 atgatcagcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg
 361 aatattgcac aatgggggaa accctgatgc agccatgccg cgtgtgtgaa gaaggccttc
 421 gggttgtaaa gcactttcag cgaggaggaa aggggtgaag ttaatacctt acatctgtga
 481 cgttactcgc agaagaagca cgggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggaggg
 541 tgcgagcgtt aatcggaatt actgggcgta aagcgtgcgc aggcggtttg ttaagcgaga
 601 tgtgaaagcc ccgggctcaa cctgggaacc gcatttcgaa ctggcaaacct agagtctgt
 661 agaggggggt agaattccag gtgtagcggg gaaatgcgta gagatctgga ggaataccgg
 721 tggcgaaggc ggccccctgg acaaagactg acgctcaggc acgaaagcgt ggggagcaaa
 781 caggattaga taccctggtg gtccacgccg taaacgatgt ctactcggag ttggtgtct
 841 tgaacactgg gctctcaagc taacgcatta agtagaccgc ctggggagta cggccgcaag
 901 gttaaaactc aaatgaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
 961 gatgcaacgc gaagaacctt acctactctt gacatccaca gaatctggtg gagatacctc
 1021 agtgccttcg ggaactgtga gacaggtgct gcattgctgt cgtcagctcg tttgtgaaa
 1081 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccctatcctt acttgccagc gggtaatgcc
 1141 gggaacttta gggagactgc cggtgataaa ccggaggaag gtggggacga cgtcaagtca
 1201 tcatggccct tacgagtagg gctacacacg tgctacaatg gtcagtacag aggggtgcga
 1261 agccgcgagg tggagctaata ccataaagc tggtcgtagt ccggattgga gtctgcaact
 1321 cgactccatg aagtcggaat cgctagtaat cgtggatcag aatgccacgg tgaatacgtt
 1381 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg ggctgcacca gaagtagata
 1441 gcttaacctt cgggagggcg ttaccacgg tgtggttcat gactggggtg aag

***Shewanella algae* strain DW01 16S ribosomal RNA, partial sequence**

NCBI Reference Sequence: NR_117770.1

[GenBank Graphics](#)>NR_117770.1 *Shewanella algae* strain DW01 16S ribosomal RNA, partial sequence

ATCCAGAGATTGTCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACA
 TTCAAAGCTTGCTTTTGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATTTGCCCATTTG
 TGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGG
 GCCTTGCGCTGATGGATAAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGA
 TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC
 GGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGGTGTAAAGTTAATACCTTACATCTGTGACGTTACTCGC
 AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATT
 ACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACC
 GCATTTGCAACTGGCAAACCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGT
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCT
 TGAACACTGGGCTCTCAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTC
 AAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
 ACCTACTCTTGACATCCACAGAATCTGGTAGAGATACCTCAGTGCCTTCGGGAACCTGTGAGACAGGTGCT
 GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTT
 ACTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACCTTtagggagactGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGA
 CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGCGA
 AGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
 AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
 CCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGG
 TGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTC

Query: None Query ID: lcl|Query_471337 Length: 1280
 >*Shewanella algae* strain DW01 16S ribosomal RNA, partial sequence
 Sequence ID: NR_117770.1 Length: 1495
 Range 1: 80 to 1360
 Score:2246 bits (1216), Expect:0.0,
 Identities:1255/1283(98%), Gaps:5/1283(0%), Strand: Plus/Plus

Query	1	CTTGCTTTTG-AGA-NANGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATTTGCCCATTT	58
Sbjct	80	CTTGCTTTTGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATTTGCCCATTT	139
Query	59	GTGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTWCGGGGGGAAAGCA	118
Sbjct	140	GTGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTAC-GGGGGAAAGCA	198
Query	119	GGGGACCTTCGGGCCTTGCSCTGATGGATAAGCCCAGGTGGGATTAGYTAGTAGGTGAGG	178
Sbjct	199	GGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTGATGGATAAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTAGGTGAGG	258
Query	179	TAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTYTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG	238
Sbjct	259	TAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG	318
Query	239	AYTGAGACACGGCCCAGACTCYTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGG	298
Sbjct	319	ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGG	378
Query	299	AAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTC	358
Sbjct	379	AAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTC	438

Query	359	AGCGAGGAGGAAAGGGTGTAAGTTAATACCTTACATCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAG	418
Sbjct	439	AGCGAGGAGGAAAGGGTGTAAGTTAATACCTTACATCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAG	498
Query	419	CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAA	478
Sbjct	499	CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAA	558
Query	479	TTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	538
Sbjct	559	TTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTC	618
Query	539	AACCTGGGAACCGCATTTTGAAGTGGCAAAGTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC	598
Sbjct	619	AACCTGGGAACCGCATTTTGAAGTGGCAAAGTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC	678
Query	599	AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT	658
Sbjct	679	AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT	738
Query	659	GGACAAAGACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	718
Sbjct	739	GGACAAAGACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG	798
Query	719	TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGMACTGGGCTCTCAA	778
Sbjct	799	TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAA	858
Query	779	GCTAACGCATTARRTAGACCGCTGGGKAGTACGGSCGCAAGGKTAARACTTCAAATGAA	838
Sbjct	859	GCTAACGCATTAAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC-TCAAATGAA	917

Query	839	TTGRMGGGGGGCCSGCRCARGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC	898
Sbjct	918	TTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC	977
Query	899	CTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATTTGTTAGAGATACATCAGTGCCTTCGGGAACTG	958
Sbjct	978	CTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATCTGGTAGAGATACCTCAGTGCCTTCGGGAACTG	1037
Query	959	TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCG	1018
Sbjct	1038	TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCG	1097
Query	1019	CAACGAGCGCAACCCCTATCCTTACTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACTTTAGGGAGAC	1078
Sbjct	1098	CAACGAGCGCAACCCCTATCCTTACTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACTTTAGGGAGAC	1157
Query	1079	TGCCGGTGATAAACC GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT	1138
Sbjct	1158	TGCCGGTGATAAACC GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT	1217
Query	1139	AGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCT	1198
Sbjct	1218	AGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCT	1277
Query	1199	AATCCCATAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG	1258
Sbjct	1278	AATCCCATAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG	1337
Query	1259	AATCGCTAGTAATCGTG-ATCAG	1280
Sbjct	1338	AATCGCTAGTAATCGTGGATCAG	136

Lampiran 2. Hasil sekuensing dan penyelarasan sekuens isolat MB-SL6

>5262909_C_63F

TGACTTCGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG
 AAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGAT
 GCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAG
 GTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTG
 GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC
 GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCG
 GCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTAGCGACGGAAGAAGCACCGGCTAAC
 TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACT
 GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCT
 CAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTATAGTACTGTATAGGGGGGTAG
 AATTTACGTGCACTCGCTGAAATGCACAGAGACTTGAAGGAATACCTGTGGCCAT
 TTCGCCCCTCTGGACCGATACTCTCTCATATCTCACACTCGTGGTGACCCAACT
 CGATTAGATTCCCTCGCTACGCCCCTGCNCTAAACGCATGTAGCCCTCGCGAGCA
 NNNTCGACCNTCAGCNCCTTGATCTAGTGACTCTACTTCTTGAATCCAAACCCGC
 CAGGGACACGACTTGTCCGCCACTGTTAGCCCTCCGCTTGCTATCGGG

>5256030_C_1387R

CTGATCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATC
 CGGACTACGACGCACTTTTTGGGATTGCTCACTTTTCGCAAGTTGGCCGCCCTCT
 GTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTG
 ACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCCCGA
 CATTACTCGCTGGCAAACAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
 ACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCG
 AAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCT
 TCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAA
 TTCATTTGAGTTTAAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTT
 AGCTCCGAAAGCCACGGCTCAAGGCCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGC
 GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCATCTGAGTGT
 CAGTATCTGTCCAGGGGGCGCCTTCGCCACCGGTATTCTTCAGATCTCTACGC
 ATTTACCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGT
 TTCAAATGCTATTCCGAGGTTGAGCCCCGGGCTTTTACATCTGACTTAACAAACCA
 CCTGCATGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTAC
 CGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTGCTAACGTCAAACAA
 CGCCGCTATTAACGACACCGCCTTCCTCACGACTGAAAGTACTTTACAACCCGAAG
 GCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATT
 CCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGGGGCTG
 ATCATCCTCTCAAACAGCTAGGGAATCGTCGCCTTGGTGAGCCCTTACCTACCA
 ACTAGCTAATCCACCTAGGCATTTCTGAACCGAAAAGGCCCGAAGGTCCCCC
 CTTTTGGCCCCTAAGCTTCAGGCGGAATTAACCATCCGTTTCAAGGGTTTTCCCC
 CC

>Consensus

TGACTTCGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG
 AAATTGCCCTGATGKGGGGGAWAACCMTTGGAACGGATGGYTAATWCCGCMTG
 AWGCTASGGGCCAAAAGRGGGGGACCTTCGGGCCTTYTCGSKTCAGGAWATGC
 CTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATTCCCT
 AGCTGGTYTGAGAGGATGATCAGCCMCACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGAYTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC
 ATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGA
 AGGCCGYGTGCTTAATAGCGGCGTTGTTGACGTTAGCGCARGAAGAAGCACCG
 GCTAAGCTCCGTCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGA
 ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCG
 GGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAKAGTACTGTAKAGGGG
 GGTAATTTCASGTGYACKCGSTGAAATGCRYAGAGAYYTGAAGGAATACCKGTG
 GCSAWKKCGSCCCYCTGGACMGATACTSWCWCTCAKATCKCRMAMKCGTGKGA
 SCMAACWSGATTAGATWCCCTCGSTACGYCCMYGCCSTAAACGCATGTASYMCTY
 GCGAGCRTTGTGRCCTTSAGCCCSTKGMTYTMGTGACKCTAMYKCKTGTAATSY
 ARACCCGCCWGGGASASKACTKGTCCGCCAMKRRTARMCTCMRMTGWRYTRW
 CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG
 GAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGG
 GTTAAGTCCCAGACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTGG
 GAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
 AGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAG
 AGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGG
 ATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAG

Hasil Blast menunjukkan isolat MB-SL 6 memiliki kemiripan 90.53% dengan *V. alginolyticus*

The screenshot shows the NCBI BLAST results page for a nucleotide sequence. The search was performed against the rRNA_typestrains/16S_ribosomal_RNA database. The top hit is Vibriolysin strain NBRC 15630, with a 90.53% identity and 100% coverage. The page includes a 'Filter Results' section and a table of sequences producing significant alignments.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Ident	Accession
Vibriolysin strain NBRC 15630 16S ribosomal RNA partial sequence	Vibriolysin	1853	1853	100%	0.0	90.53%	1541	NR_122890.1
Vibriolysin strain MBRC 15630 16S ribosomal RNA partial sequence	Vibriolysin	1853	1853	100%	0.0	90.53%	1541	NR_122890.1

***Vibrio alginolyticus* strain NBRC 15630 16S ribosomal RNA, partial sequence**

NCBI Reference Sequence: NR_122050.1

[FASTA Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS NR_122050 1541 bp rRNA linear BCT 12-MAR-2019

DEFINITION *Vibrio alginolyticus* strain NBRC 15630 16S ribosomal RNA, partial sequence.

ACCESSION NR_122050

VERSION NR_122050.1

DBLINK Project: [33175](#)BioProject: [PRJNA33175](#)

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE *Vibrio alginolyticus*ORGANISM [Vibrio alginolyticus](#)

Bacteria; Pseudomonadati; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1541)

AUTHORS Cao, Y. and Hu, C.-J.

TITLE Genome sequence of the human-pathogenic bacterium *Vibrio alginolyticus* Type Strain ATCC 17749T

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1541)

CONSRTM NCBI RefSeq Targeted Loci Project

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-JUN-2014) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA

REFERENCE 3 (bases 1 to 1541)

AUTHORS Cao, Y. and Hu, C.-J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-AUG-2013) Department of Laboratory Medicine, Jinan Military General Hospital, No. 25, Shifan Road, Jinan, Shandong 250031, China

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence is identical to CP006718:2185411-2186951.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1541

/organism="*Vibrio alginolyticus*"

/mol_type="rRNA"

/strain="NBRC 15630"

/culture_collection="ATCC:[17749](#)"/culture_collection="NBRC:[15630](#)"/type_material="type strain of *Vibrio alginolyticus*"/db_xref="taxon:[663](#)"[rRNA](#) <1..>1541

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 agagtttgat catggctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc
 61 ggaaacgagt tatctgaacc ttcggggaac gataacggcg tcgagcggcg gacgggtgag
 121 taatgcctag gaaattgccc tgatgtggg gataaccatt ggaaacgatg gctaataccg
 181 cataatgcct acgggccaaa gagggggacc ttcgggcctc tcgcgtcagg atatgcctag
 241 gtgggattag ctagtgtgtg aggtaagggc tcaccaaggc gacgatccct agctggtctg
 301 agaggatgat cagccacact ggaactgaga cacggtccag actcctacgg gaggcagcag
 361 tggggaatat tgcacaatgg gcgcaagcct gatgcagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg
 421 ccttcgggtt gtaaagcact ttcagtcgtg aggaaggcgg cgtcgtaat agcggcgttg
 481 ttgacgtta gcgacagaag aagcacgggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg
 541 gaggggtcga gcgttaatcg gaattactgg gcgtaaagcg catgcagggtg gttgttaag
 601 tcagatgtga aagcccgggg ctcaacctcg gaatagcatt tgaaactggc agactagagt
 661 actgtagagg ggggtagaat ttcaggtgta gcggtgaaat gcgtagagat ctgaaggaat
 721 accggtggcg aaggcggccc cctggacaga tactgacact cagatgcgaa agcgtgggga
 781 gcaaacagga ttgataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgtctact tggaggtgt
 841 ggccttgagc cgtggcttc ggagctaacg cgtaagtag accgcctggg gagtacggtc
 901 gcaagattaa aactcaaatg aattgacggg ggccgcaca agcgggtggag catgtggttt
 961 aattcgatgc aacgcgaaga acctaccta ctctgacat ccagagaact ttccagagat
 1021 ggattggtgc ctcgggaac tctgagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtg
 1081 tgaaatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccta tcctgtttg ccagcgagta
 1141 atgtcgggaa ctccaggag actgccggtg ataaaccgga ggaagggtgg gacgacgtca
 1201 agtcatcatg gcccttacga gtagggctac acacgtgcta caatggcgca tacagagggc
 1261 ggccaacttg cgaaagttag cgaatcccaa aaagtgcgtc gtagtccgga ttggagtctg
 1321 caactcgact ccatgaagtc ggaatcgcta gtaatcggtg atcagaatgc cacggtgaat
 1381 acgttcccg gcttgtaca caccgccgt cacaccatgg gagtgggctg caaaagaagt
 1441 aggtagtta acctcgggg ggacgcttac cacttgtgg tcatgactg ggggtgaagtc
 1501 gtaacaaggt agcgctaggg gaacctggcg ctggatcacct

***Vibrio alginolyticus* strain NBRC 15630 16S ribosomal RNA, partial sequence**

NCBI Reference Sequence: NR_122050.1

[GenBank Graphics](#)>NR_122050.1 *Vibrio alginolyticus* strain NBRC 15630 16S ribosomal RNA, partial sequence

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGT
TATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCC
TGATGTGGGGGATAACCATTGGAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGC
GACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG
CCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTA
GCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCG
GAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGT
GGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTA
TCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTGCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGC
GGCCAACCTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTGCTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAGAAGTAGGTAGTTTAACCTTCGGGGGGACGCTTAC
CACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCGCTAGGGGAACCTGGCGCTGGATCACCT

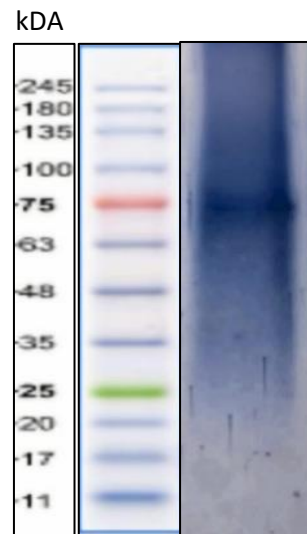
Query: None Query ID: lcl|Query_1926079 Length: 1310
 >*Vibrio alginolyticus* strain NBRC 15630 16S ribosomal RNA, partial sequence
 Sequence ID: NR_122050.1 Length: 1541
 Range 1: 80 to 1365
 Score:1853 bits(1003), Expect:0.0,
 Identities:1185/1309(91%), Gaps:25/1309(1%), Strand: Plus/Plus

Query	4	CTTCGGGG-ACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCC	62
Sbjct	80	CTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCC	139
Query	63	CTGATGKGGGGGAWAACCMTTGGAAACGGATGGYTAATWCCGCMTGAWGCYTASGGGCCA	122
Sbjct	140	CTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAAC-GATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCC-	197
Query	123	AAAGRGGGGGACCTTCGGGCCTTYTCGSKTCAGGAWATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTT	182
Sbjct	198	AAAGAGGGGGACCTTCGGGCC-TCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTT	256
Query	183	GGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATTCCCTAGCTGGTYTGAGAGGATGATCAGCC	242
Sbjct	257	GGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGA-TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC	315
Query	243	MCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGAYTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC	302
Sbjct	316	ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC	375
Query	303	AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA	362
Sbjct	376	AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA	435

Query	363	GTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGYGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTAGCGAC	422
Sbjct	436	GCACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTAGCGAC	495
Query	423	RGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTT	482
Sbjct	496	AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTT	555
Query	483	AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCC	542
Sbjct	556	AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCC	615
Query	543	CGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAKAGTACTGTAKAGGGGGGT	602
Sbjct	616	CGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGT	675
Query	603	AGAATTTTCASGTGYACKCGSTGAAATGCRYAGAGAYTTGAAGGAATACCKGTGGCSAWKK	662
Sbjct	676	AGAATTTTCAGGTGTAG-CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGG	734
Query	663	CGSCCCYCTGGACMGATACTSWCWCTCAKATCKCRMAMKCGTGGKGASCMAACWSGATTA	722
Sbjct	735	CGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATG-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA	793
Query	723	GATWCCCTCGSTACGYCCMYGCCSTAAACGCATGTASYMCTYCGAGCRTTGTTCGRCTT	782
Sbjct	794	GATACCCTGG-TA-GTCCACGCCGTAAACG-ATGTCTA-CTTG-GAGG-TTGTGG-CCTT	846
Query	783	SAGCCCSTKGMTYTMGTGACKCTAMYKCKTGTAATSYARACCCGCCWGGGASASKACTKG	842
Sbjct	847	GAGCCG-TGGCTTTCG-GAG-CTAACGCGT-TAAGT-AGACC-GCCTGGGG-AGTACG-G	898

Query	843	TCCGCCAMKRRTTARMMCTCMRMTGWRYTRWCGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG	902
Sbjct	899	TC-GCAAGA-TTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG	956
Query	903	GTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAG	962
Sbjct	957	GTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAG	1016
Query	963	AGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT	1022
Sbjct	1017	AGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT	1076
Query	1023	GTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCG	1082
Sbjct	1077	GTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCG	1136
Query	1083	AGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGAC	1142
Sbjct	1137	AGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGAC	1196
Query	1143	GTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGA	1202
Sbjct	1197	GTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGA	1256
Query	1203	GGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAG	1262
Sbjct	1257	GGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAG	1316
Query	1263	TCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTG-ATCAG	1310
Sbjct	1317	TCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAG	1365

Lampiran 3. Hasil analisis SDS-PAGE Protease F.12 *Shewanella algae*



Lampiran 4. Hasil uji SPSS

Ukuran luka hari ke-3 terhadap kelompok perlakuan
Kelompok perlakuan

Case Processing Summary

		Valid		Cases Missing		Total	
Kelompok perlakuan		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Ukuran luka hari ke-3	kontrol negatif	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	Kontrol positif	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	Protease 0.1%	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	Protease 0.5%	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	Protease 1%	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

Descriptives

Kelompok perlakuan		Statistic	Std. Error
Ukuran luka hari ke-3	kontrol negatif	Mean	9.4200
		95% Confidence Interval	.12410
		Lower Bound	9.0755
		Upper Bound	9.7645
		5% Trimmed Mean	9.4278
		Median	9.5000
		Variance	.077
		Std. Deviation	.27749
		Minimum	9.00

		Maximum	9.70	
		Range	.70	
		Interquartile Range	.50	
		Skewness	-.927	.913
		Kurtosis	.130	2.000
	Kontrol positif	Mean	8.8600	.07483
		95% Confidence Interval	Lower Bound	8.6522
		for Mean	Upper Bound	9.0678
		5% Trimmed Mean	8.8667	
		Median	8.9000	
		Variance	.028	
		Std. Deviation	.16733	
		Minimum	8.60	
		Maximum	9.00	
		Range	.40	
		Interquartile Range	.30	
		Skewness	-1.089	.913
		Kurtosis	.536	2.000
	Protease 0.1%	Mean	8.5800	.08602
		95% Confidence Interval	Lower Bound	8.3412
		for Mean	Upper Bound	8.8188
		5% Trimmed Mean	8.5833	

	Median	8.6000	
	Variance	.037	
	Std. Deviation	.19235	
	Minimum	8.30	
	Maximum	8.80	
	Range	.50	
	Interquartile Range	.35	
	Skewness	-.590	.913
	Kurtosis	-.022	2.000
	Protease 0.5% Mean	9.4600	.09274
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9.2025
		Upper Bound	9.7175
	5% Trimmed Mean		9.4611
	Median		9.5000
	Variance		.043
	Std. Deviation		.20736
	Minimum		9.20
	Maximum		9.70
	Range		.50
	Interquartile Range		.40
	Skewness		-.236
			.913
	Kurtosis		-1.963
			2.000

Protease 1%	Mean	9.3000	.09487
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9.0366
		Upper Bound	9.5634
	5% Trimmed Mean	9.3056	
	Median	9.3000	
	Variance	.045	
	Std. Deviation	.21213	
	Minimum	9.00	
	Maximum	9.50	
	Range	.50	
	Interquartile Range	.40	
	Skewness	-.524	.913
	Kurtosis	-.963	2.000

Extreme Values^a

Kelompok perlakuan				Case Number	Value
Ukuran luka hari ke-3	kontrol negatif	Highest	1	5	9.70
			2	4	9.60
		Lowest	1	2	9.00
			2	1	9.30
	Kontrol positif	Highest	1	6	9.00
			2	10	9.00
		Lowest	1	7	8.60

	Protease 0.1%	Highest	2	8	8.80
			1	13	8.80
		Lowest	2	11	8.70
			1	15	8.30
	Protease 0.5%	Highest	2	12	8.50
			1	18	9.70
		Lowest	2	17	9.60
			1	19	9.20
	Protease 1%	Highest	2	20	9.30
			1	21	9.50
		Lowest	2	24	9.50
			1	23	9.00
			2	25	9.20

a. The requested number of extreme values exceeds the number of data points. A smaller number of extremes is displayed.

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Kelompok perlakuan		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ukuran luka hari ke-3	kontrol negatif	.213	5	.200*	.939	5	.656
	Kontrol positif	.201	5	.200*	.881	5	.314
	Protease 0.1%	.141	5	.200*	.979	5	.928
	Protease 0.5%	.180	5	.200*	.952	5	.754

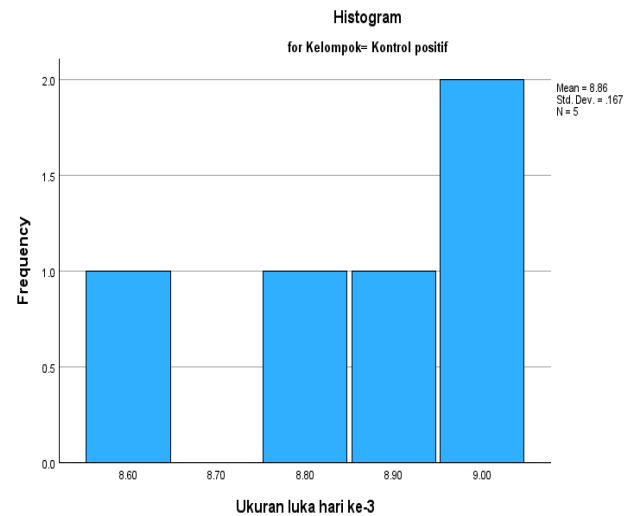
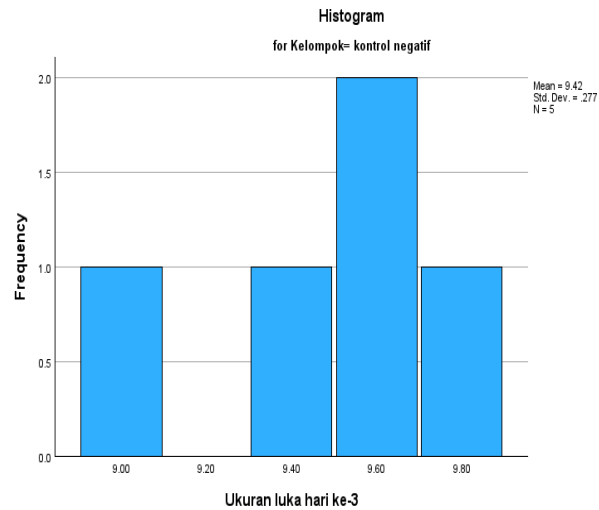
Protease 1%	.227	5	.200*	.910	5	.468
-------------	------	---	-------	------	---	------

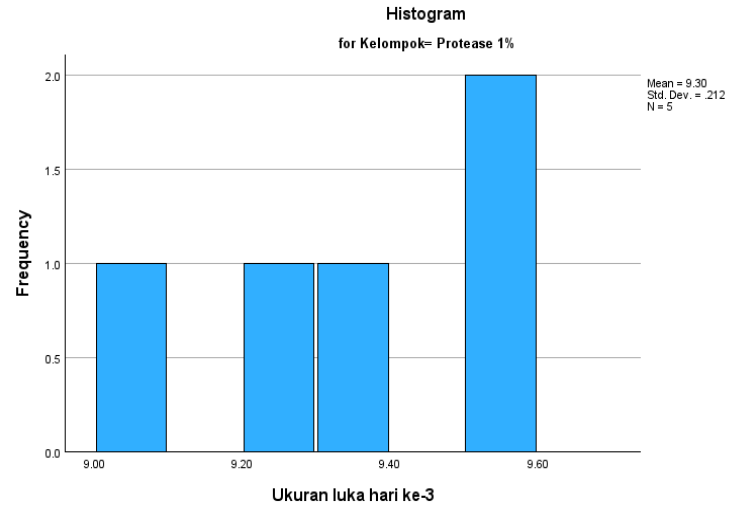
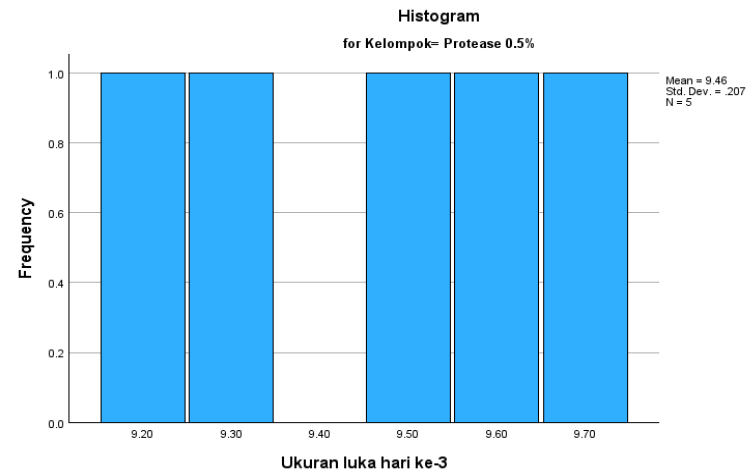
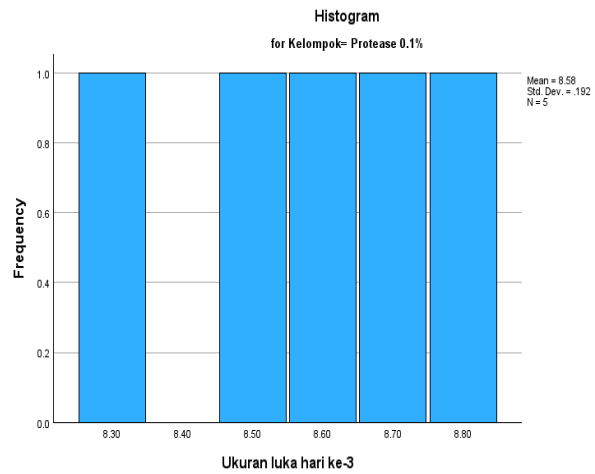
*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Ukuran luka hari ke-3

Histograms





Stem-and-Leaf Plots

1. Ukuran luka hari ke-3 Stem-and-Leaf Plot for

Kelompok= kontrol negatif

Frequency Stem & Leaf

2.00 9 . 03

3.00 9 . 567

Stem width: 1.00

Each leaf: 1 case(s)

2. Ukuran luka hari ke-3 Stem-and-Leaf Plot for

Kelompok= Kontrol positif

Frequency Stem & Leaf

3.00 8 . 689

2.00 9 . 00

Stem width: 1.00

Each leaf: 1 case(s)

3. Ukuran luka hari ke-3 Stem-and-Leaf Plot for

Kelompok= Protease 0.1%

Frequency Stem & Leaf

1.00 8 . 3

4.00 8 . 5678

Stem width: 1.00

Each leaf: 1 case(s)

4. Ukuran luka hari ke-3 Stem-and-Leaf Plot for

Kelompok= Protease 0.5%

Frequency Stem & Leaf

2.00 9 . 23

3.00 9 . 567

Stem width: 1.00

Each leaf: 1 case(s)

5. Ukuran luka hari ke-3 Stem-and-Leaf Plot for

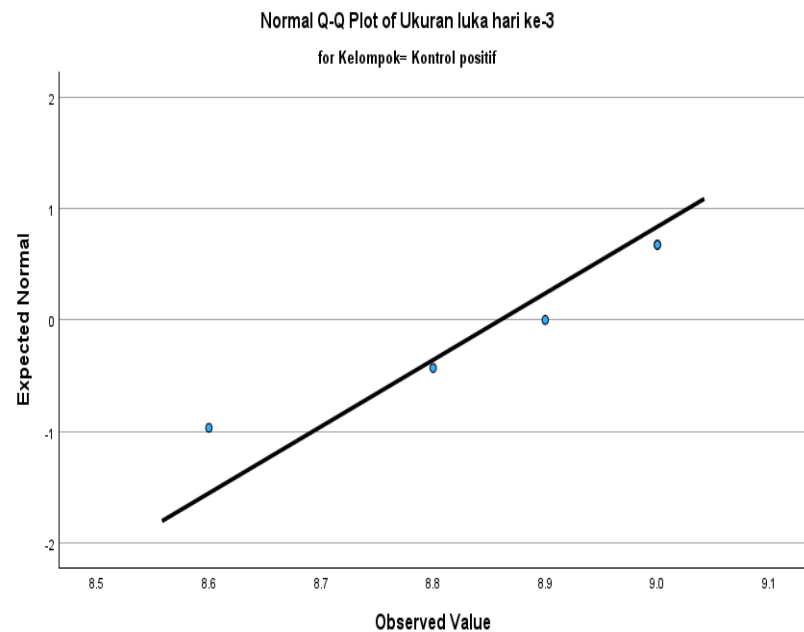
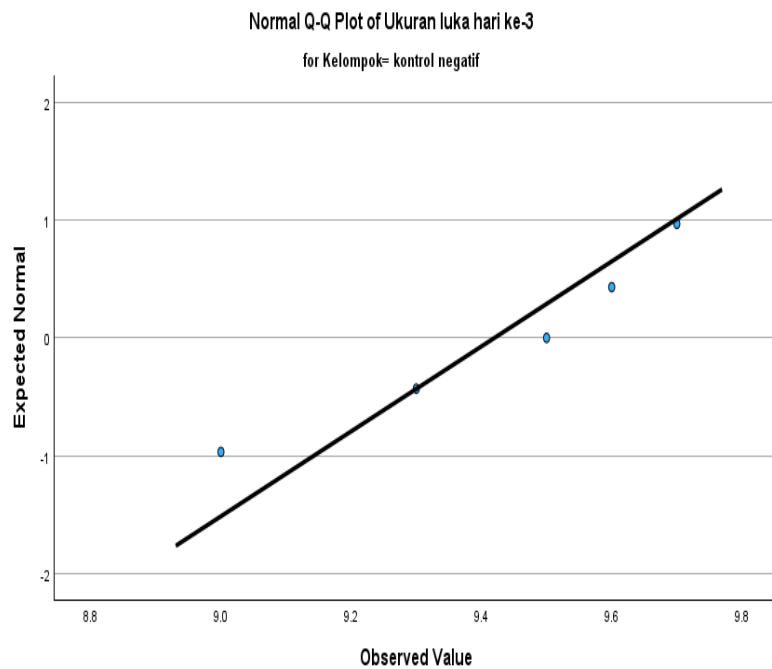
Kelompok= Protease 1%

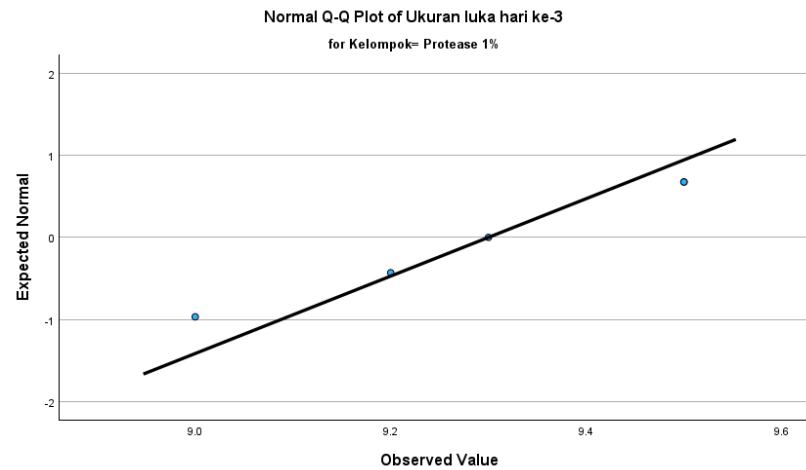
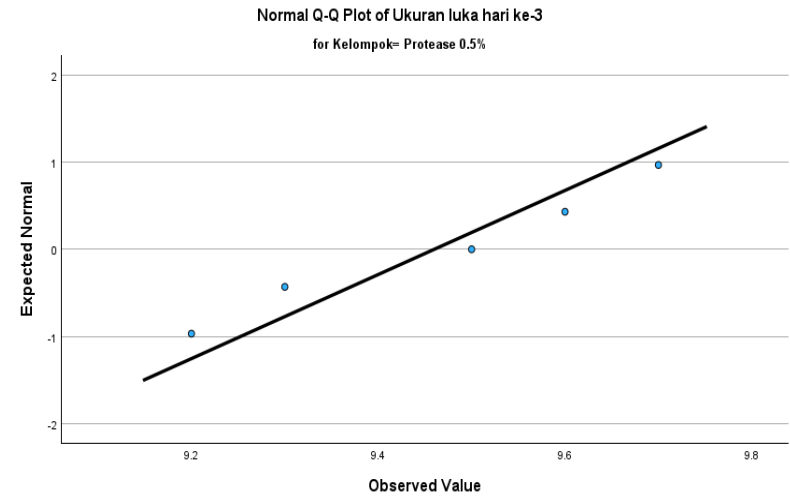
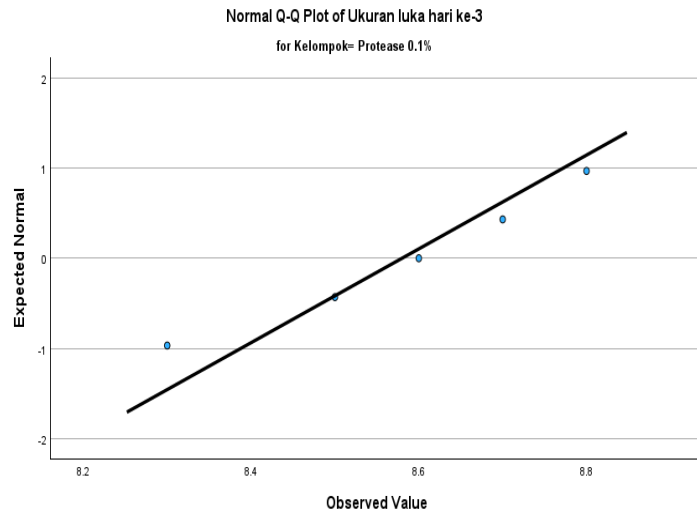
Frequency Stem & Leaf

3.00 9 . 023

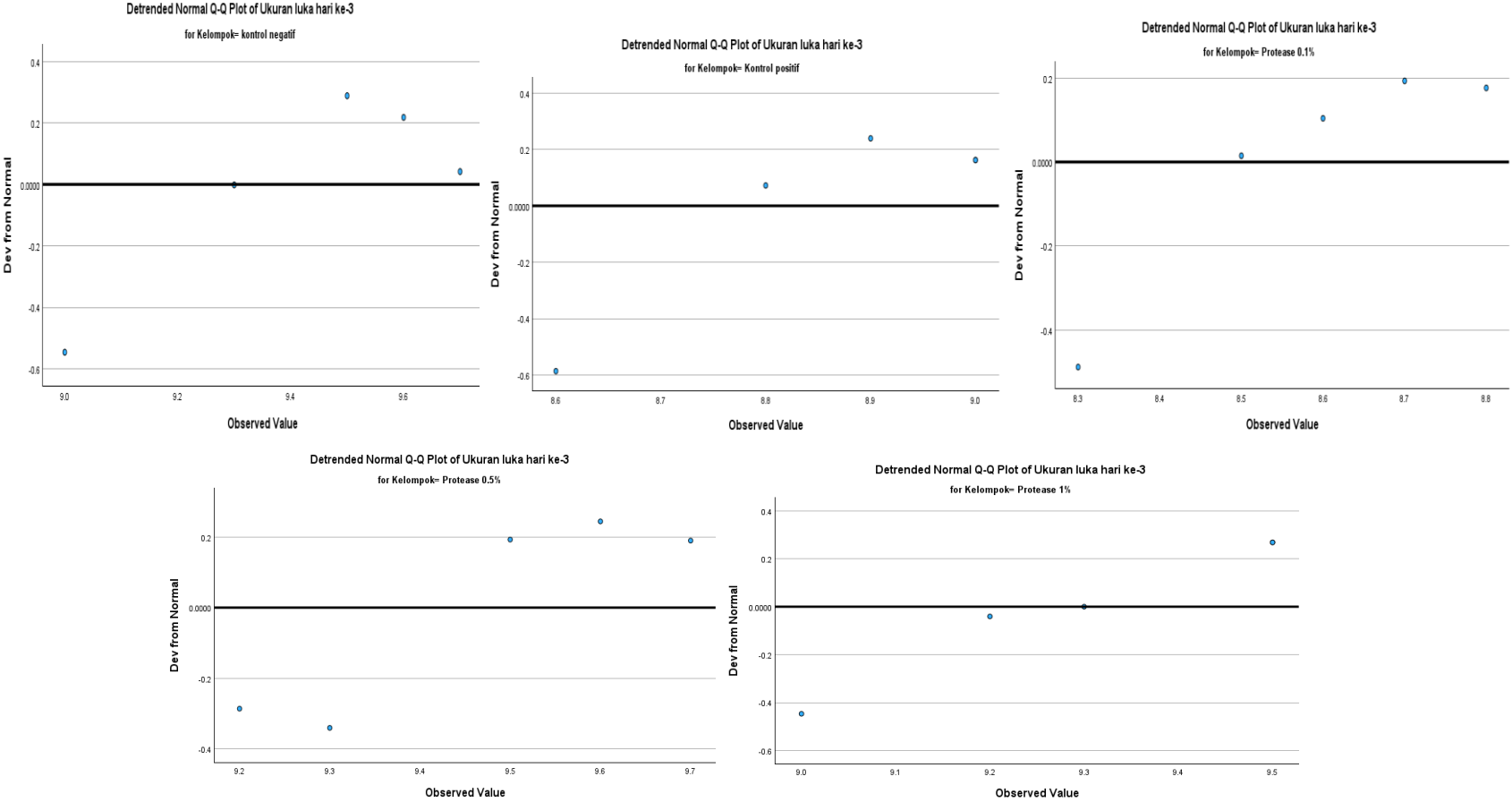
2.00 9 . 55
Stem width: 1.00
Each leaf: 1 case(s)

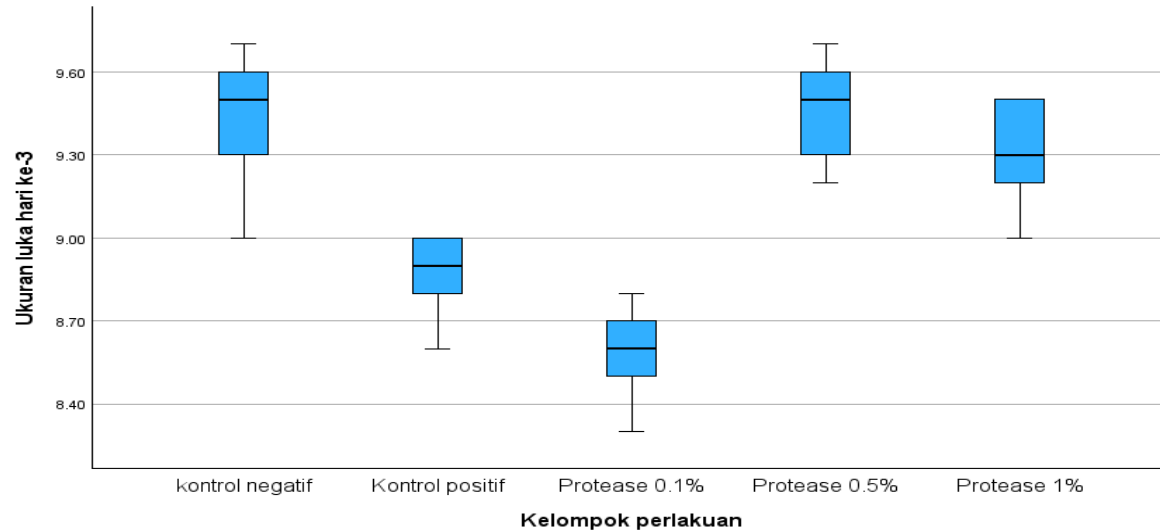
Normal Q-Q Plots





Detrended Normal Q-Q Plots





1. Uji normalitas Shapiro-Wilk

Hipotesis:

H_0 : Data berdistribusi normal

H_1 : Data tidak berdistribusi normal

Aturan keputusan:

Jika Sig. (p-value) > 0.05 → Terima H_0 → Data BERDISTRIBUSI NORMAL

Jika Sig. (p-value) ≤ 0.05 → Tolak H_0 → Data TIDAK berdistribusi normal

Uji normalitas Shapiro-Wilk pada ukuran luka hari ke-3 menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki distribusi data yang normal ($p > 0.05$), dengan nilai p berkisar antara 0.314 hingga 0.928. Kelompok protease 0.1% menunjukkan distribusi paling mendekati normal ($W = 0.979$, $p = 0.928$), mengindikasikan konsistensi respons penyembuhan yang tinggi. Terpuhinya asumsi normalitas memungkinkan penggunaan uji parametrik (One-Way ANOVA) untuk analisis komparatif antar kelompok."

Kesimpulan Akhir: Data hari ke-3 sangat baik untuk analisis statistik parametrik, dan hasil uji normalitas yang positif ini memperkuat validitas dan reliabilitas temuan penelitian

Oneway :

Descriptives

Ukuran kuka hari ke-3

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol negatif	5	9.4200	.27749	.12410	9.0755	9.7645	9.00	9.70
Kontrol positif	5	8.8600	.16733	.07483	8.6522	9.0678	8.60	9.00
Protease 0.1%	5	8.5800	.19235	.08602	8.3412	8.8188	8.30	8.80
Protease 0.5%	5	9.4600	.20736	.09274	9.2025	9.7175	9.20	9.70
Protease 1%	5	9.3000	.21213	.09487	9.0366	9.5634	9.00	9.50
Total	25	9.1240	.40340	.08068	8.9575	9.2905	8.30	9.70

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ukuran luka hari ke-3	Based on Mean	.477	4	20	.752
	Based on Median	.256	4	20	.903
	Based on Median and with adjusted df	.256	4	15.770	.902
	Based on trimmed mean	.461	4	20	.763

ANOVA

Ukuran luka hari ke-3

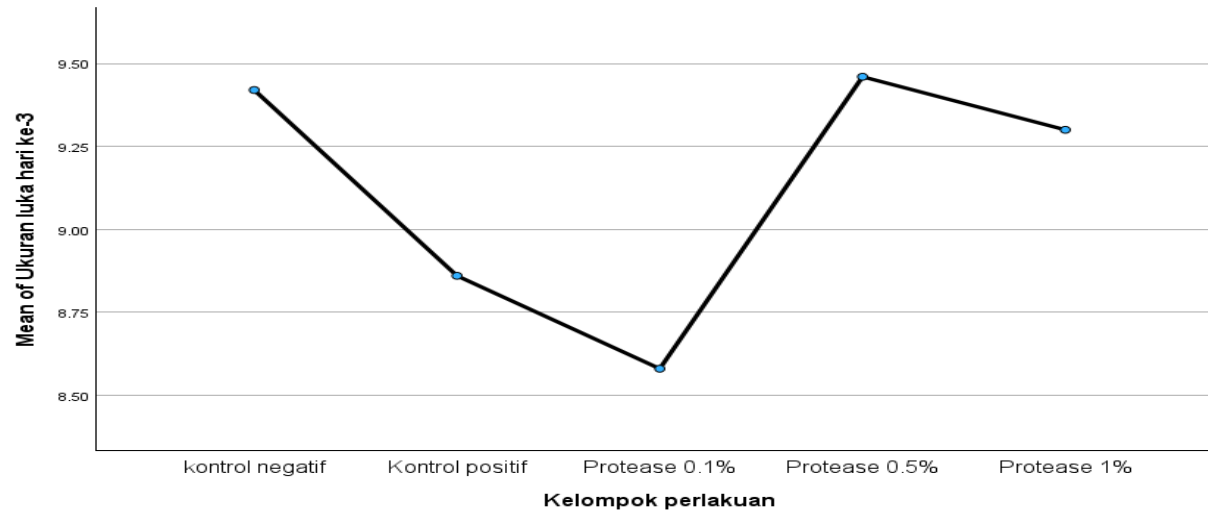
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.986	4	.746	16.226	<.001
Within Groups	.920	20	.046		
Total	3.906	24			

ANOVA Effect Sizes^a

			95% Confidence Interval	
Point Estimate			Lower	Upper
Ukuran luka hari ke-3	Eta-squared	.764	.455	.830
	Epsilon-squared	.717	.346	.796
	Omega-squared Fixed-effect	.709	.337	.789
	Omega-squared Random-effect	.379	.113	.483

a. Eta-squared and Epsilon-squared are estimated based on the fixed-effect model.

Means Plots



UJI HOMOGENITAS VARIANS DAN ANOVA UKURAN LUKA HARI KE-3

1. TESTS OF HOMOGENEITY OF VARIANCES (Levene's Test)

Levene Statistic = 0.477

Sig. = 0.752

Interpretasi:

Kriteria keputusan:

Jika Sig. > 0.05 → Varians HOMOGEN

Jika Sig. ≤ 0.05 → Varians TIDAK HOMOGEN

Kesimpulan: Sig. (0.752) > 0.05 → Varians antar kelompok HOMOGEN

Makna:

Asumsi homogenitas varians terpenuhi

Variabilitas data dalam setiap kelompok relatif sama

Aman menggunakan One-Way ANOVA (tidak perlu Welch ANOVA)

Hasil ANOVA akan valid dan dapat dipercaya

Catatan: SPSS menyediakan 4 metode perhitungan Levene (based on mean, median, dll). Semua menunjukkan $p > 0.05$, memperkuat kesimpulan homogenitas.

2.TESTS OF HOMOGENEITY OF VARIANCES (Levene's Test)

Levene Statistic = 0.477

Sig. = 0.752

Interpretasi:

Kriteria keputusan:

Jika Sig. $> 0.05 \rightarrow$ Varians HOMOGEN

Jika Sig. $\leq 0.05 \rightarrow$ Varians TIDAK HOMOGEN

Kesimpulan: Sig. (0.752) $> 0.05 \rightarrow$ Varians antar kelompok HOMOGEN

3.TABEL ANOVA

Hasil:

$F(4, 20) = 16.226$

Sig. < 0.001

Interpretasi:

Kriteria keputusan:

Jika Sig. $< 0.05 \rightarrow$ Ada perbedaan SIGNIFIKAN

Jika Sig. $\geq 0.05 \rightarrow$ TIDAK ada perbedaan signifikan

Kesimpulan: Sig. $< 0.001 \rightarrow$ Ada perbedaan SANGAT SIGNIFIKAN antar kelompok

Uji Levene menunjukkan varians antar kelompok homogen ($p = 0.752$). Analisis One-Way ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat signifikan pada ukuran luka hari ke-3 antar kelompok perlakuan ($F(4,20) = 16.226$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.764$). Effect size yang sangat besar ($\eta^2 = 76.4\%$) mengindikasikan bahwa jenis perlakuan memiliki pengaruh dominan terhadap kecepatan penyembuhan luka. Kelompok protease 0.1% menunjukkan ukuran luka terkecil (mean = 8.58 ± 0.19 mm), menandakan penyembuhan paling cepat dibandingkan kelompok lain.

Oneway**Descriptives**

Ukuran luka hari ke-3

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol negatif	5	9.4200	.27749	.12410	9.0755	9.7645	9.00	9.70
Kontrol positif	5	8.8600	.16733	.07483	8.6522	9.0678	8.60	9.00
Protease 0.1%	5	8.5800	.19235	.08602	8.3412	8.8188	8.30	8.80
Protease 0.5%	5	9.4600	.20736	.09274	9.2025	9.7175	9.20	9.70
Protease 1%	5	9.3000	.21213	.09487	9.0366	9.5634	9.00	9.50
Total	25	9.1240	.40340	.08068	8.9575	9.2905	8.30	9.70

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ukuran luka hari ke-3	Based on Mean	.477	4	20	.752
	Based on Median	.256	4	20	.903
	Based on Median and with adjusted df	.256	4	15.770	.902

Based on trimmed mean	.461	4	20	.763
-----------------------	------	---	----	------

ANOVA

Ukuran luka hari ke-3

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.986	4	.746	16.226	<.001
Within Groups	.920	20	.046		
Total	3.906	24			

ANOVA Effect Sizes^a

		Point Estimate	95% Confidence Interval	
			Lower	Upper
Ukuran luka hari ke-3	Eta-squared	.764	.455	.830
	Epsilon-squared	.717	.346	.796
	Omega-squared Fixed-effect	.709	.337	.789
	Omega-squared Random-effect	.379	.113	.483

a. Eta-squared and Epsilon-squared are estimated based on the fixed-effect model.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ukuran luka hari ke-3

		Mean			95% Confidence Interval		
(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	kontrol negatif	Kontrol positif	.56000*	.13565	.004	.1541	.9659
		Protease 0.1%	.84000*	.13565	<.001	.4341	1.2459
		Protease 0.5%	-.04000	.13565	.998	-.4459	.3659
		Protease 1%	.12000	.13565	.899	-.2859	.5259
	Kontrol positif	kontrol negatif	-.56000*	.13565	.004	-.9659	-.1541
		Protease 0.1%	.28000	.13565	.273	-.1259	.6859
		Protease 0.5%	-.60000*	.13565	.002	-1.0059	-.1941
		Protease 1%	-.44000*	.13565	.030	-.8459	-.0341
	Protease 0.1%	kontrol negatif	-.84000*	.13565	<.001	-1.2459	-.4341
		Kontrol positif	-.28000	.13565	.273	-.6859	.1259
		Protease 0.5%	-.88000*	.13565	<.001	-1.2859	-.4741
		Protease 1%	-.72000*	.13565	<.001	-1.1259	-.3141
	Protease 0.5%	kontrol negatif	.04000	.13565	.998	-.3659	.4459
		Kontrol positif	.60000*	.13565	.002	.1941	1.0059
		Protease 0.1%	.88000*	.13565	<.001	.4741	1.2859
		Protease 1%	.16000	.13565	.763	-.2459	.5659

Scheffe	Protease 1%	kontrol negatif	-.12000	.13565	.899	-.5259	.2859
		Kontrol positif	.44000*	.13565	.030	.0341	.8459
		Protease 0.1%	.72000*	.13565	<.001	.3141	1.1259
		Protease 0.5%	-.16000	.13565	.763	-.5659	.2459
	kontrol negatif	Kontrol positif	.56000*	.13565	.012	.1007	1.0193
		Protease 0.1%	.84000*	.13565	<.001	.3807	1.2993
		Protease 0.5%	-.04000	.13565	.999	-.4993	.4193
		Protease 1%	.12000	.13565	.938	-.3393	.5793
	Kontrol positif	kontrol negatif	-.56000*	.13565	.012	-1.0193	-.1007
		Protease 0.1%	.28000	.13565	.400	-.1793	.7393
		Protease 0.5%	-.60000*	.13565	.006	-1.0593	-.1407
		Protease 1%	-.44000	.13565	.065	-.8993	.0193
	Protease 0.1%	kontrol negatif	-.84000*	.13565	<.001	-1.2993	-.3807
		Kontrol positif	-.28000	.13565	.400	-.7393	.1793
		Protease 0.5%	-.88000*	.13565	<.001	-1.3393	-.4207
		Protease 1%	-.72000*	.13565	.001	-1.1793	-.2607
	Protease 0.5%	kontrol negatif	.04000	.13565	.999	-.4193	.4993
		Kontrol positif	.60000*	.13565	.006	.1407	1.0593
		Protease 0.1%	.88000*	.13565	<.001	.4207	1.3393
		Protease 1%	.16000	.13565	.842	-.2993	.6193
	Protease 1%	kontrol negatif	-.12000	.13565	.938	-.5793	.3393
		Kontrol positif	.44000	.13565	.065	-.0193	.8993

Protease 0.1%	.72000*	.13565	.001	.2607	1.1793
Protease 0.5%	-.16000	.13565	.842	-.6193	.2993

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

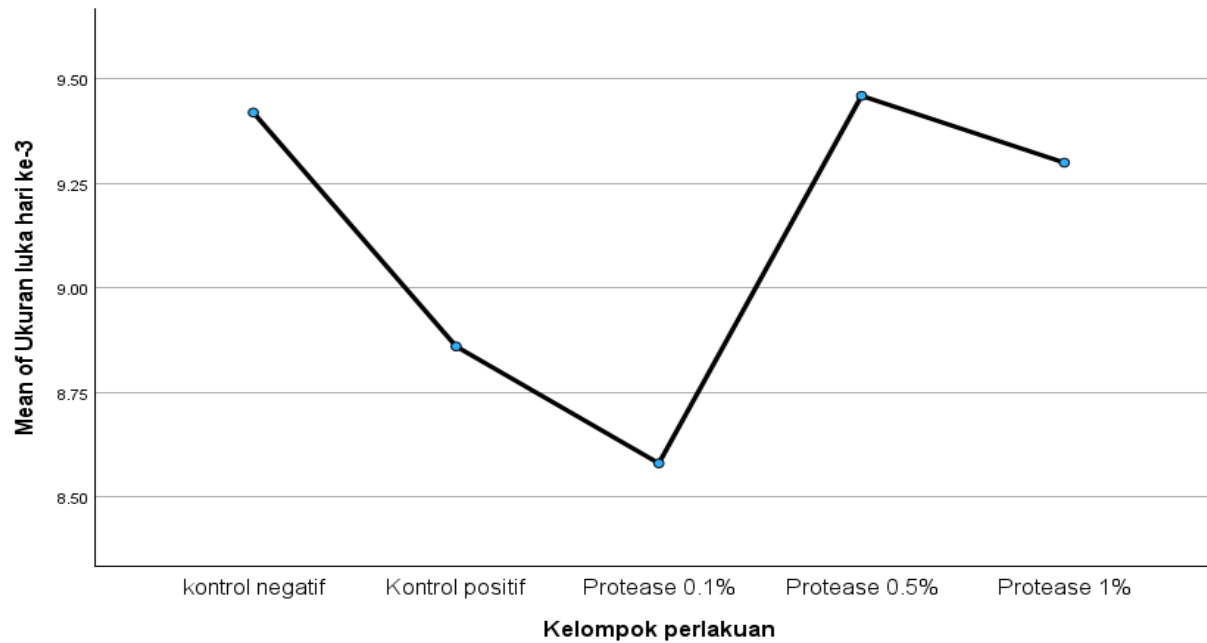
Homogeneous Subsets

Ukuran luka hari ke-3					
			Subset for alpha = 0.05		
	Kelompok perlakuan	N	1	2	3
Tukey HSD ^a	Protease 0.1%	5	8.5800		
	Kontrol positif	5	8.8600		
	Protease 1%	5		9.3000	
	kontrol negatif	5		9.4200	
	Protease 0.5%	5		9.4600	
	Sig.		.273	.763	
Scheffe ^a	Protease 0.1%	5	8.5800		
	Kontrol positif	5	8.8600	8.8600	
	Protease 1%	5		9.3000	9.3000
	kontrol negatif	5			9.4200
	Protease 0.5%	5			9.4600
	Sig.		.400	.065	.842

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Means Plots

**UJI POST-HOC TUKEY HSD UKURAN LUKA HARI KE-3****1. MULTIPLE COMPARISONS (Perbandingan Berpasangan)**

Hasil Uji Tukey HSD:

Kriteria keputusan:

Jika Sig. < 0.05 → Ada perbedaan SIGNIFIKAN

Jika Sig. ≥ 0.05 → TIDAK ada perbedaan signifikan

A. Protease 0.1% sebagai Kelompok Terbaik:

Interpretasi:

Protease 0.1% memiliki ukuran luka secara signifikan lebih kecil (lebih baik) dibandingkan kontrol negatif, Protease 0.5%, dan Protease 1%

Protease 0.1% SETARA dengan kontrol positif (obat standar), menunjukkan efektivitas yang sama baiknya

B. Kontrol Positif vs Kelompok Lain:

Interpretasi:

Kontrol positif lebih efektif dibandingkan kontrol negatif dan kedua konsentrasi protease tinggi (0.5% dan 1%)

C. Interpretasi:

Konsentrasi tinggi (0.5% dan 1%) memiliki efektivitas setara dengan kontrol negatif (tanpa perlakuan)

Ini menunjukkan bahwa konsentrasi tinggi tidak efektif dalam mempercepat penyembuhan luka. Perbandingan Antar Konsentrasi Protease Tinggi:

2. HOMOGENEUS SUBSETS (Pengelompokan Efektivitas)

Interpretasi:

Subset 1: Protease 0.1% dan Kontrol positif berada dalam kelompok yang sama → efektivitas SETARA dan TERBAIK

Subset 2: Protease 0.5%, 1%, dan kontrol negatif berada dalam kelompok yang sama → efektivitas RENDAH dan tidak berbeda satu sama lain

Uji Post-hoc Tukey HSD menunjukkan bahwa kelompok Protease 0.1% (mean = 8.58 ± 0.19 mm) memiliki ukuran luka yang secara signifikan lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif (mean = 9.42 ± 0.36 mm, $p < 0.001$), Protease 0.5% (mean = 9.46 ± 0.27 mm, $p < 0.001$), dan Protease 1% (mean = 9.30 ± 0.43 mm, $p < 0.001$).

Tidak terdapat perbedaan signifikan antara Protease 0.1% dengan kontrol positif (mean = 8.86 ± 0.38 mm, $p = 0.273$), menunjukkan bahwa Protease 0.1% memiliki efektivitas setara dengan obat standar dalam mempercepat penyembuhan luka pada hari ke-5.

Analisis homogeneous subsets mengelompokkan Protease 0.1% dan kontrol positif dalam satu subset dengan efektivitas tertinggi (Subset 1, $p = 0.273$), sementara kelompok lainnya (Protease 0.5%, 1%, dan kontrol negatif) berada dalam subset dengan efektivitas lebih rendah (Subset 2, $p = 0.763$).

Temuan ini mengonfirmasi bahwa konsentrasi Protease 0.1% merupakan dosis optimal, karena konsentrasi yang lebih tinggi (0.5% dan 1%) justru menunjukkan efektivitas yang tidak lebih baik dari kontrol negatif, mengindikasikan adanya hubungan dosis-respons yang tidak linier atau kemungkinan efek toksik/inhibisi pada konsentrasi tinggi dalam mekanisme penyembuhan luka.