

Penapisan Dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik Termofilik Dari Sumber Air Panas Pantai Moinit, Sulawesi Utara

(*Screening and Characterization of Proteolytic Thermophiles Bacteria from Moinit Coastal Hot-Spring, North Sulawesi*)

Elvy Like Ginting

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado Indonesia 95115

e-mail: like.ginting@unsrat.ac.id

ABSTRACT

Thermophilic bacteria have been recognized as the ideal producers of thermostable enzymes and therefore they have long time become an interesting target for research. Thermophilic proteolytic bacteria from Moinit coastal hot-spring North Sulawesi Indonesia have been isolated and some of them, have been identified and reported. In this research, we reported another eleven thermophilic proteolytic bacteria from Moinit coastal hot-spring, North Sulawesi, Indonesia which designated as 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4a, 11a, 11b, 16a, 16b and 16c. Those thermophilic proteolytic bacteria had different colony and cell morphology characteristics, and biochemical characteristics. Bacterial isolate 1a, 1b, 2a, 16a and 16c were Gram negative-bacilli, 3a, 3b and 11b were Gram positive-bacilli, 4a, 11a and 16b were Gram positive-coccus. These bacterial isolates had the ability to produce proteolytic activities at 55°C. This showed their ability to produce thermostable protease extracellularly which has potential to explore on biotechnological industries.

Keywords: Moinit, protease, screening, thermophilic

ABSTRAK

Bakteri termofilik dikenal sebagai produsen enzim termostabil dan menjadi target yang menarik untuk diteliti. Bakteri proteolitik termofil dari sumber air panas pantai Moinit Sulawesi Utara telah berhasil diisolasi dan bahkan 5 isolat bakteri telah diidentifikasi dan dilaporkan. Dalam tulisan ini, diuraikan sebelas isolat bakteri proteolitik termofil lainnya dalam kemampuannya menghasilkan protease dan karakteristik bakteri tersebut. Kesebelas bakteri adalah 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4a, 11a, 11b, 16b, 16b, 16b, dan 16c yang menunjukkan karakteristik morfologi koloni dan sel bakteri, serta karakteristik biokimia yang berbeda. Isolat 1a, 1b, 2a, 16a, 16c adalah Gram negatif-basil, isolat 3a, 3b, 11b adalah Gram positif-basil, dan isolat 4a, 11a, 16b adalah Gram positif-kokus. Keseluruhan isolat bakteri ini memiliki kemampuan aktivitas proteolitik pada 55°C. Hal ini menunjukkan kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan protease termostabil ekstraseluler yang berpotensi untuk dieksplorasi dalam pemanfaatannya dalam bidang industri bioteknologi.

Kata kunci: Moinit, protease, penapisan, termofilik

PENDAHULUAN

Bakteri yang mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan bersuhu tinggi dikenal sebagai bakteri termofilik. Bakteri termofilik memiliki suatu daya tarik tersendiri yakni kemampuannya dalam menghasilkan enzim yang stabil terhadap panas dan bahkan enzim yang dihasilkan mampu mengkatalis reaksi kimia dengan

cepat pada suhu tinggi (Friedman *dkk*, 1992).

Penggunaan bakteri termofilik dalam proses fermentasi industri (Van de Burg, 2003) memberikan beberapa keuntungan seperti pendinginan fermenter yang tidak diperlukan sehingga biaya fermentasi lebih rendah, banyak enzim yang disekresikan dan viskositas kaldu kultur bakteri yang rendah. Salah satu enzim yang dihasilkan

oleh bakteri termofilik yang bersifat stabilitas terhadap panas adalah protease.

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

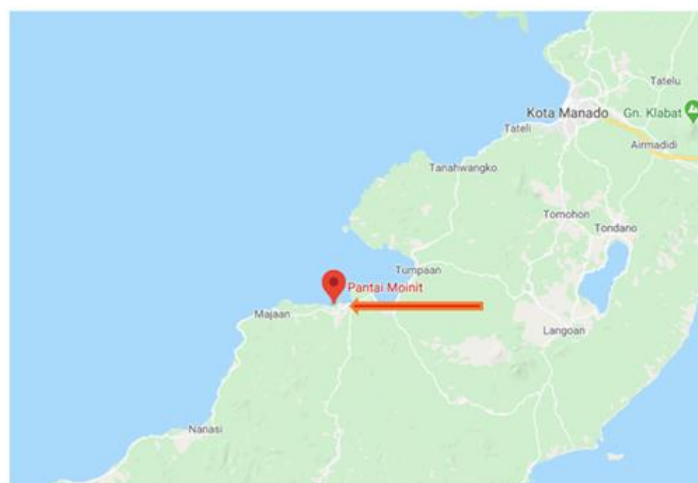
Di perairan laut, bakteri termofilik dijumpai di sistem hidrotermal perairan dangkal dan di sumber air panas dasar laut. Beberapa hasil penelitian di perairan hidrothermal menunjukkan terdapat berbagai jenis bakteri termofilik diantaranya : *Thermus aquaticus*, *Bacillus caldolyticus*

dan *Bacillus caldotenax* (Dwidjoseputro,1990). Eksplorasi bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal telah dilakukan dan akan terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Sulawesi Utara memiliki beberapa sumber air panas perairan laut yang merupakan habitat bakteri termofilik dan mengandung bakteri termofilik yang beragam. Salah satu sumber air panas perairan laut tersebut adalah perairan pantai Moinit. Penelitian ini ingin mengungkap bakteri termofilik penghasil protease dari perairan pantai Moinit, Sulawesi Utara. Dari penelitian di lokasi ini telah berhasil diisolasi 20 isolat bakteri termofil dari sumber air panas dengan 16 isolat bakteri memiliki kemampuan menghasilkan protease. Kelima isolat bakteri telah dilaporkan sebelumnya (Ginting *dkk*, 2019) dan tulisan ini menguraikan sebelas isolat bakteri lainnya dalam kemampuannya menghasilkan protease pada suhu 45-55°C dan karakteristik bakteri tersebut.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel

Sampel air laut diambil pada beberapa titik sesuai dengan sumber air panas di perairan pantai Moinit Sulawesi Utara (Gambar 1). Sampel air laut diambil langsung dengan menggunakan botol steril, dan langsung dibawa ke Laboratorium untuk pengujian lebih lanjut.



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel

Kultur dan isolasi bakteri

Media kultur bakteri yang digunakan adalah Thermus Medium Modified (TMM) dengan komposisi 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 % K_2HPO_4 , 0.35% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% NaCl, 0.05% Yeast extract, 0.05% peptone. 100 μ l sampel dimasukkan ke dalam tabung berisi 10 ml TMM, selanjutnya diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 – 48 jam. Adanya prumbuhan bakteri, ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

Tahap isolasi bakteri, diawali dengan mengambil bakteri dari kultur bakteri dengan menggunakan jarum ose steril dan menumbuhkan kembali ke dalam media Thermus Medium Modified Agar (TMMA/0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 % K_2HPO_4 , 0.35% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% NaCl, 0.05% Yeast extract, 0.05% peptone, 2% agar), dengan cara gores kuadran sehingga mendapatkan koloni bebas. Setiap koloni bebas bakteri yang tumbuh, diamati berdasarkan karakteristik morfologi (bentuk, warna, elevasi dan tepian) dan diisolasi untuk ditumbuhkan secara terpisah.

Penentuan bakteri termofilik penghasil protease

Setiap koloni bakteri ditotol ke media padat TMMA yang mengandung skim milk sebanyak 0,2% (media uji) dengan menggunakan jarum ose. Diinkubasi pada suhu 45 dan 55°C selama 12-48 jam. Kemampuan bakteri untuk menghasilkan protease ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni biakan tersebut.

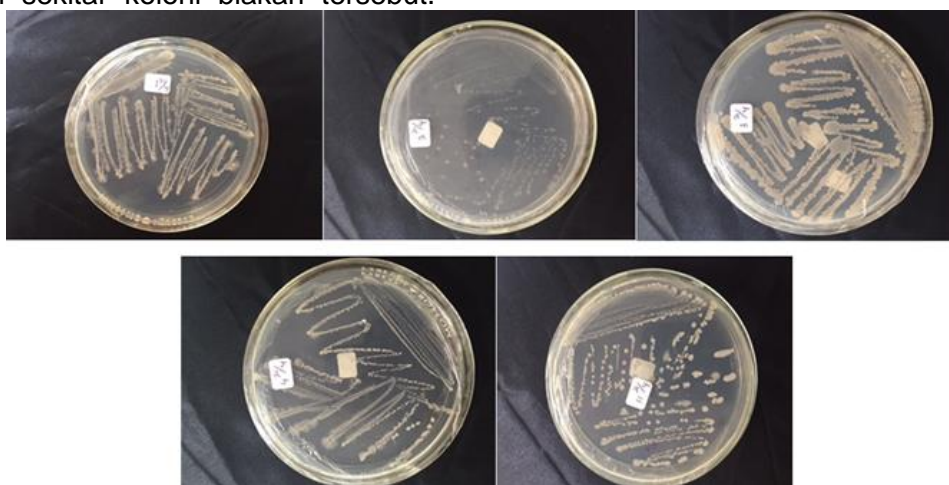
Dengan adanya zona bening menunjukkan adanya hidrolisis protein oleh protease dari bakteri tersebut. Hal ini diekspresikan sebagai Indeks Proteolitik (IP) yang didefinisikan sebagai rasio antara diameter zona bening di sekitar koloni dan diameter koloni (Baehaki *dkk*, 2011).

Karakterisasi bakteri secara mikrobiologi

Penentuan bentuk dan warna sel diamati sebagai hasil yang ditimbulkan sebagai akibat pewarnaan Gram (Hadioetomo (1993). Uji fisiologi untuk menentukan ada tidaknya pergerakan (motilitas) bakteri dilakukan dengan menggunakan media semi padat. Pengujian aktivitas biokimia dilaksanakan berdasarkan Bergey's manual (Holt *dkk*, 1994) dengan menggunakan beberapa uji seperti: (1) Uji fermentasi karbohidrat, (2) Uji indol, (3) Uji methyl red, (4) Uji-Lysin, (5) Uji Voges – Proskauer, (6) Uji sitrat, (7) Uji katalase dan (8) Uji produksi H_2S .

HASIL DAN PEMBAHASAN

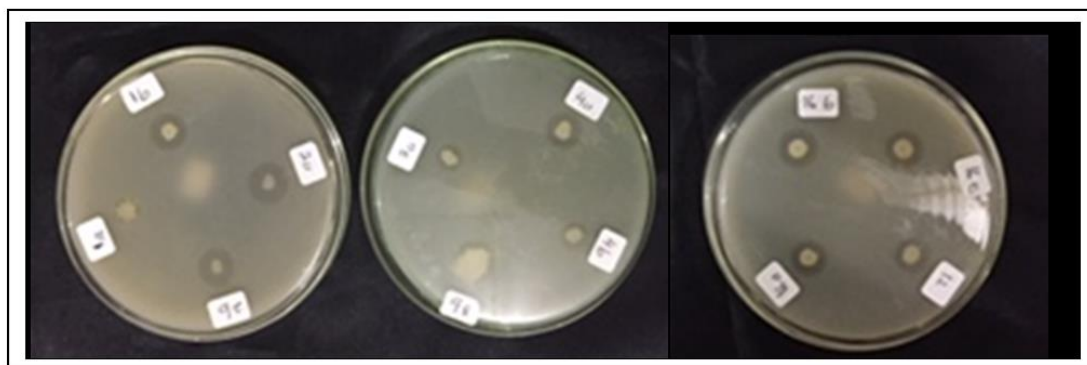
Penelitian ini berhasil mengisolasi 20 isolat bakteri termofil dari sumber air panas perairan pantai Moinit (Gambar 2), yang tumbuh pada suhu 55°C dengan karakteristik morfologi yang berbeda (Tabel 1). Kemampuan bakteri menghidrolisis protein, ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni yang tumbuh saat bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium yang mengandung protein (skim milk) (Gambar 3).



Gambar 2. Pertumbuhan beberapa isolat bakteri termofilik (1a, 2a, 3a, 4a, 11a)

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni bakteri termofilik

No.	Isolat	Bentuk koloni	Warna	Permukaan	Tepian
1.	1a	bulat sangat kecil	coklat kekuningan	agak cembung	melingkar rata
2.	1b	bulat kecil	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
3.	2a	bulat kecil	coklat muda	datar	melingkar rata
4.	2b	bulat	coklat muda	datar	tidak beraturan
5.	3a	bulat kecil	coklat susu	cembung	bergerigi
6.	3b	bulat	coklat susu	cembung	melingkar rata
7.	4a	bukit kecil	coklat kekuningan	datar	melingkar rata
8.	4b	bulat	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
9.	7	bulat kecil	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
10.	8	bulat sangat kecil	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
11.	9a	bulat	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
12.	9b	bulat	coklat kekuningan	datar	bergerigi
13.	11a	bulat kecil	coklat kekuningan	cembung	bergerigi
14.	11b	bulat	coklat kekuningan	datar	melingkar rata
15.	12	bulat kecil	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
16.	13	bulat kecil	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
17.	14	bulat	coklat kekuningan	cembung	melingkar rata
18.	16a	bulat kecil	kuning muda susu	cembung	melingkar rata
19.	16b	bulat	kuning muda susu	cembung	bergerigi
20.	16c	bulat	kuning muda susu	cembung	melingkar rata



Gambar 3. Zona bening yang terbentuk disekeliling koloni bakteri yang menunjukkan adanya aktivitas protease dari bakteri termofilik.

Dari hasil penapisan bakteri termofilik yang dapat menghidrolisis protein pada suhu 45°C selama waktu inkubasi 12 jam, diperoleh 10 isolat bakteri, sedangkan satu isolat bakteri pada lama inkubasi 24 jam. Pada suhu 55°C, 8 isolat bakteri memiliki kemampuan menghidrolisis protein pada masa inkubasi 24 jam dan pada saat mencapai 48 jam seluruh isolat bakteri mampu menghidrolisis protein (Tabel 2). Berdasarkan hasil ini menunjukkan bahwa beberapa isolat bakteri membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama dalam menghidrolisis protein.

Kemampuan bakteri proteolitik dalam menghidrolisis protein

pada suhu 55°C mengindikasikan kemampuannya dalam menghasilkan protease tahan panas. Enzim tahan panas memiliki beberapa keuntungan untuk aplikasi bioteknologi seperti (1) biaya fermentasi/bahan baku yang lebih rendah, (2) penurunan viskositas kaldu kultur, (3) persyaratan sterilitas tidak seketat mesofil, (4) kemungkinan biomassa rendah untuk produk tinggi, (5) mensekresi banyak enzim, (6) menyederhanakan pemulihan produk volatil, (7) stabilitas enzim, (8) lebih tahan daripada mesofilik terhadap deterjen dan denaturants, dan (9) memiliki aktivitas spesifik yang lebih tinggi daripada enzim mesofilik (Bergquist *dkk*, 1987).

Kristjansson (1991): Madigan, *dkk* (2009) mengemukakan bahwa bakteri termofilik memiliki banyak perbedaan dengan bakteri mesofilik. Bakteri termofilik memiliki kemampuan untuk bertahan hidup pada suhu tinggi disebabkan karena oleh membrane sel, stabilitas enzim dan makromolekul sel yang teradaptasi. Enzim dari bakteri termofilik lebih tahan panas dengan sistem sintesis protein yang dapat berfungsi dengan baik pada suhu tinggi.

Bakteri termofilik memiliki jumlah enzim yang lebih besar dan protein yang terdapat pada sel memiliki ikatan hidrofobik dan ikatan ionik yang sangat kuat. Asam lemak jenuh mendominasi komposisi membrane selnya sehingga bersifat lebih stabil dan fungsional pada suhu tinggi. Keadaan ini dikarenakan oleh kuatnya ikatan hidrofobik pada rantai asam lemak jenuh jika dibandingkan dengan asam lemak tak jenuh.

Tabel 2. Index Proteolitik pada suhu 45 dan 55°C pada masa inkubasi 12-48 jam

No.	Isolat	Index Proteolitik			
		45°C		55°C	
		12 jam	24 jam	24 jam	48 jam
1	1a	1.15	1.20	1.45	1.45
2	1b	1.20	1.20	1.22	1.22
3	2a	1.10	1.10	2.50	2.50
4	3a	0.86	0.86	2.10	2.40
5	3b	-	0.45	-	0.72
6	4a	0.95	1.05	1.55	1.55
7	11a	0.86	1.10	0.92	1.12
8	11b	1.02	1.10	1.10	1.10
9	16a	0.92	1.00	1.50	1.75
10	16b	1.10	1.14	-	1.55
11	16c	0.88	1.14	-	1.55

Indeks proteolitik isolat bakteri 2a dan 3a berkisar antara 2.40-2.50 yang menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut memiliki kemampuan yang baik dalam menghasilkan protease. Jani *dkk*, 2016 menyatakan bahwa berdasarkan indeks proteolitik, organisme dapat dikategorikan baik dalam menghasilkan protease jika indeks proteolitik >2.0-5.0. Lebih lanjut, Lakshmi *dkk* (2014) menyatakan bahwa indeks proteolitik dalam media cawan agar dapat digunakan untuk menggambarkan kemampuan menghasilkan protease. Akan tetapi indeks proteolitik hanya menggambarkan kemampuan menghasilkan protease tapi tidak bisa digunakan untuk menentukan besar kemampuan dalam menghasilkan protease (Ningthoujam dan Kshetri, 2010; Zilda *dkk*, 2012). Indeks proteolitik mengindikasikan kemampuan relative dalam mengasilkan protease.

Berdasarkan hasil pewarnaan gram dari setiap isolat bakteri proteolitik termofil

menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat Gram positif dan gram negatif. Isolat 1a, 1b, 2a, 4a, 11a, 16a, 16b, dan 16c bersifat Gram positif, sedangkan isolat 3a, 3b, dan 11b bersifat Gram negatif (Tabel 3). Ciri bakteri Gram positif memiliki warna ungu atau violet. Hal ini disebabkan karena zat warna kristal violet tetap dipertahankan walaupun telah diberi larutan pemucat atau lugol (Lay, 1994). Dinding sel bakteri Gram positif lebih tebal dari dinding sel bakteri Gram negatif (Pelczar dan Chan, 1986) dengan komponen peptidoglikan tebal. Peptidoglikan merupakan suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang tergabung, merupakan eksoskeleton yang kaku pada dinding sel (Jawetz *dkk*, 2005). Sedangkan bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan tipis. Bagian terluar dinding sel bakteri Gram negatif adalah membran luar. Struktur membran luar terdiri dari fosfolipid (lapisan dalam) dan lipopolisakarida (bagian luar) (Purwoko, 2007).

Bentuk dari bakteri proteolitik termofil yang dihasilkan adalah basil (batang) dan kokus (bulat) (Gambar 4). Isolat 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 11b, 16a dan 16c berbentuk basil, sedangkan isolat 4a, 11a dan 16b berbentuk kokus. Bakteri berbentuk basil, dicirikan oleh bakteri *Bacillus* sp, sedangkan bentuk kokus dicirikan oleh bakteri *Staphylococcus* sp. Lebih lanjut, isolat bakteri proteolitik termofil memiliki sifat motil dan non-motil. Uji motilitas dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri dalam melakukan gerakan. Bakteri yang memiliki sifat motil, dapat melakukan gerakan yang ditunjukkan oleh adanya flagella atau cilia sebagai alat geraknya. Pergerakan bakteri ini dilakukan untuk adaptasi dalam bertahan hidup (Pollitt dan Diggle, 2017). Dilain pihak, bakteri non-motil tidak memiliki alat gerak berupa flagel (Cappucino dan Sherman, 2010).

Hasil uji biokimia seperti uji indol, katalase, lysin, MR, VP, H₂S, Citrat dan fermentasi karbohidrat, menunjukkan hasil yang bervariasi. Aktivitas biokimia berdasarkan produk akhir dari proses metabolisme merupakan pengamatan yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi. Metabolisme yang terjadi pada bakteri yaitu fermentasi, respirasi aerobik dan respirasi anaerobik (Schelegel, 1993). Produk-produk akhir dari metabolisme ini digunakan untuk menentukan karakteristik biokimia bakteri yang menunjukkan perbedaan karakter

fisiologis dari setiap isolat bakteri yang mengindikasikan perbedaan genus/spesies dari setiap bakteri. Berdasarkan Bergey's Manual (Holt dkk, 1994), isolat 1a, 1b, 2a, dan 16c menyerupai ciri genus *Bacillus* sp, isolat 3a, 3b, dan 16a menyerupai ciri genus *Thermotoga* sp. sedangkan isolat 4a, 11a dan 16b menyerupai ciri genus *Streptococcus* sp. Agar bakteri proteolitik termofil ini dapat teridentifikasi sempurna, identifikasi secara molekular dengan menggunakan teknik PCR sedang dilaksanakan di laboratorium, untuk menelaah profil DNA gen 16S-rRNA.

Panda dkk (2012); Wilson dan Remigio (2012); Pathak dan Rathod (2014) melaporkan bahwa *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* dan *Staphylococcus thermophilus* telah berhasil diisolasi dari sumber air panas. Bakteri ini mampu menghasilkan enzim hidrolitik (Pathak dan Rathod, 2014). *Thermotoga* sp. diketahui merupakan bakteri termofilik dengan suhu pertumbuhan optimal pada suhu ≥ 70 ° C dan ditemukan pada berbagai habitat hidrothermal seperti dasar laut (Swithers dkk, 2011) serta telah dipelajari secara ekstensif sebagai wawasan dasar bagi kehidupan pada suhu tinggi yang bermanfaat dalam bidang bioteknologi (Frock, dkk, 2010) karena dapat menghasilkan enzim tahan panas seperti selulase (Xu dkk, 2015) dan protease (Ward dkk, 2002).

Tabel 3. Karakteristik biokimia bakteri proteolitik termofil

Isolat	Bentuk	Gram	Mot	Indol	Kat	Uji Morfologi				Gas	Lysin	MR	VP	H ₂ S	Cit
						Fermentasi Karbohidrat									
						Glu	Suk	Lak	Fruk						
1a	Basil	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
1b	Basil	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
2a	Basil	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
3a	Basil	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
3b	Basil	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
4a	Kokus	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
11a	Kokus	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
11b	Basil	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
16a	Basil	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16b	Kokus	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
16c	Basil	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+

Mot: motility, Ind:indol, kat:katalase, Glu:glukosa, Suk:sukrosa, Fruk:fruktosa, MR:metil red, Cit:citrate

KESIMPULAN

Sebelas isolat bakteri termofil dari sumber air panas perairan pantai Moinit

Sulawesi Utara terkarakterisasi memiliki karakteristik morfologi dan biokimia yang berbeda. Bakteri termofilik ini memiliki kemampuan menghasilkan protease tahan panas karena dapat dihasilkan pada suhu 55°C. Hasil penelitian ini menunjukkan potensi bioteknologi dari protease yang diproduksi secara ekstraseluler oleh bakteri proteolitik termofilik ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki, A., Rinto, Budiman, A. 2011 Isolation and characterization of protease from bacterial Swamp Land Indralaya. *J. Teknol and Food Industry* 22(1):37–42.
- Berquist, P.L., Love, D.R., Croft, J.E., Streiff, M.B., Daniel, R.M., Morgan, W.H. 1987. Genetics and potential biotechnological applications of thermophilic and extremely thermophilic microorganisms. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 5: 199–237.
- Cappuccino, J.G., Sherman, N. 2010. *Microbiology: A laboratory manual*. Ninth Edition. New York: Addison – Wesley Publishing Company.
- Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre, M.P.C., Schwan, R.F. 2008. Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:2027–2034.
- Dwidjoseputro, D. 1990. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Penerbit Djambatan Jakarta.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi dasar dalam praktek teknik dan prosedur dasar Laboratorium*. PT Gramedia. Jakarta.
- Friedman, S. M. 1992. Thermophilic microorganisms. *Encyclop. Microbial.* 4:217–229.
- Frock, A.D., Notey, J.S., Kelly, R.M. 2010. The genus *Thermotoga*: Recent developments. *Environ Technol.* 31(10): 1169–1181.
- Ginting, E.L, Kemer, K., Wullur, S., Uria, A.R. 2019. Identification of proteolytic thermophiles from Moinit coastal hot-spring, North Sulawesi, Indonesia. *Geomicrobiology Journal* 37(1): 50–58.
- Holt, J. G. N. R., Krieg. Ph, A., Sneath. J. T., Staley, Williams. S. T. 1994. *Bergey's manual of determination bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore. 475 hal.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. 2001. *Mikrobiologi kedokteran*. Edisi 2. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Kristjansson, J. K. 1991. *Thermophilic bacteria*. CRC Press. Florida.
- Lakshmi, B.K.M., Ratnasri, P.V., Devi, K.A., Hemalatha, K.P.J. 2014. Screening, optimization of producing and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology* 3(2): 435–443.
- Lay, W. B. 1994. *Analisis mikroba di laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Madigan, Marthinko, Stahl, Clark. 2012. *Biology of microorganisms*. Pearson Education, Inc. San Francisco, CA 94111.
- Ninghoujam D. S., Kshetri P. 2010 A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant *Bacillus subtilis* strain SH1. *Australian J.Basic Appl Sci.* 4: 5126–5134.
- Panda, M.K., Sahu, M.K., Tayung, K. 2012. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian Journal of Microbiol.* 5(2): 159–165.
- Pathak, A.P., Rathod, M.G. 2014. Cultivable bacterial diversity of terrestrial thermal spring of Unkeshwar, India. *J Biochem.* 5(4): 814–818.
- Pelczar, M. J. Jr, Chan, E. C. S. 1998, *Dasar- dasar mikrobiologi 2*. Cetakan 1. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.

- Pollitt, E. J. G., Diggle, S. P. 2017. Defining motility in the Staphylococci. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16): 2943–2958.
- Purwoko, C. 2007. Fisiologi mikroba. Edisi I. PT Bumi Akasara, Jakarta.
- Rai, S.K., Roy, J.K., Mukherjee, A.K. 2010. Characterization of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis* sp. Nov. AS-S24-II. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1437–1450.
- Schelegel, S.G. 1993. General microbiology. Crambridge University Press. Great Britain. 688p.
- Synowiecki, J. 2010. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 7020–7025.
- Swithers, K.S., DiPippo, J.L, Bruce, D.C., Detter, C., Tapia, R., Han, S., Saunders, E., Foodwin, L., Han, J., Woyke, T., Pittluck S., Pennacchio, L, Nolan, M., Mikhailova, N., Lykidis, A., Land, M., Brettin, T., Stetter, K.O., Nelson, K.E., Gogarten, J.P., Noll, K.M. 2011. Genome sequence of *Thermotoga* sp. strain RQ2, a hyperthermophilic bacterium isolated from a geothermal heated region of sea seafloor near Ribeira Quente, the Azores. *Journal of Bacteriologi* 193 : 5869–5870.
- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 213–218.
- Ward, O. P. 1983. Proteinase. In microbial enzyme and biotechnology. W. M. Fogarty. Applied Science Publisher. New York.
- Wilson, P. Remigio, Z. 2012. Production and characterization of protease enzyme Produced by a novel moderate thermophilic bacterium (EP1001) isolated from an alkaline hot spring, Zimbabwe. *African Journal of Microbiology Research* 6(27): 5542–5551.
- Xu, H., Han, D., Xu, Z. 2015. Expression of heterologous cellulases in *Thermotoga* sp. strain RQ2. *BioMed Research International* 2015:11.
- Zilda, D.S., Harmayani, E., Widada, J., Asmara, W., Irianto, H.E., Patantis, G., Fawzya, Y.N. 2012. Screening of thermostable protease producing microorganisms isolated from Indonesia Hot spring. *Squalen* 7(3): 105–114.