

**AKTIVITAS BAKTERI PROTEOLITIK YANG DIISOLASI DARI SUMBER AIR PANAS
SINGGAHAN, TUBAN**

**PROTEOLYTIC MICROORGANISMS ACTIVITY ISOLATED FROM HOT SPRING
SINGGAHAN, TUBAN**

Yeni Nur Rusdwitasari* dan Prima Retno Wikandari

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

State University of Surabaya

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, email: kim.hyeni@rocketmail.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri penghasil protease termostabil dari sumber air panas Singgahan, Tuban (Jawa Timur) serta menentukan aktivitas protease isolat. Isolasi bakteri dilakukan menggunakan media Luria Bertani (LB). Penapisan dilakukan menggunakan media skim milk agar. Pengujian aktivitas proteolitik secara kuantitatif dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan reagen Folin Ciocalteu. Diantara 75 isolat yang diperoleh dari hasil isolasi, 27 isolat bakteri mampu tumbuh pada media skim milk agar pada suhu inkubasi 53°C dan memiliki potensi sebagai penghasil protease dengan indeks proteolitik (IP) 1.8-9. Isolat dengan nilai indeks proteolitik relatif besar kemudian diuji aktivitas proteolitik secara kuantitatif dengan metode kolorimetri. Aktivitas protease kasar tertinggi dimiliki oleh ST-30 yaitu sebesar 0.2520 U/mL dengan nilai IP 9 serta mampu bertahan sampai suhu 75°C.

Kata-kata kunci: Bakteri termofilik, indeks proteolitik, aktivitas proteolitik

Abstract. This research aim to get thermostable bacteria producing protease from hot spring Singgahan, Tuban (Jawa Timur) and determined the protease activity. Isolation was carried out using Luria Bertany (LB) medium while the screening using skim milk agar medium. Proteolytic activity quantitatively done with colorimetric method using Folin Ciocalteu. Total of 75 strains of thermophilic bacteria were isolated and 27 isolate bacteria grew well at skim milk agar medium in high temperature (53°C) and have potential as protease producing bacteria with proteolytic index (PI) of 1.8-9. Isolate with high relative proteolytic index tested with colorimetric method. Crude protease ST-30 had the highest activity that was 0.2520 U/mL, PI 9 and had ability to endure temperature until 75°C.

Keywords : Thermophile bacteria, proteolytic index, proteolytic activity

PENDAHULUAN

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalis reaksi kimia pada makhluk hidup. Enzim memiliki sifat-sifat yang unik antara lain dapat aktif dalam jumlah yang sangat kecil dimana satu molekul enzim tunggal dapat melangsungkan pengubahan molekul substrat menjadi produk. Spesifitas enzim amat tinggi terhadap substratnya, enzim mempunyai kemampuan mengenali dan mengikat substrat [1].

Semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi, penggunaan enzim dalam bidang industri semakin meningkat. Salah satu enzim yang

banyak digunakan dalam bidang industri dan aplikasi bioteknologi adalah enzim protease.

Protease menyumbang 59% kebutuhan enzim pada bidang industri [3]. Protease banyak diaplikasikan dalam industri deterjen, makanan, susu, keju [2], roti, kecap, bir, pengolahan farmasi, industri film, dan daging [3].

Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan, dan mikroorganisme. Protease tanaman bergantung pada sumber tanaman dan kondisi iklim untuk pertumbuhan sedangkan protease hewan bergantung pada penyediaan hewan yang diatur oleh kebijakan pemerintah dan agrikultur. Protease mikroorganisme lebih

menguntungkan dari pada protease yang diisolasi dari tanaman maupun hewan. Hal ini dikarenakan dapat diproduksi dalam jumlah yang besar dan dalam waktu yang relatif singkat serta proses ekstraksi yang lebih mudah [2]. Protease mikroorganisme menyumbang 40% total penjualan enzim [3].

Ketersediaan enzim di dalam industri dan bioteknologi cenderung meningkat dan menuntut adanya enzim yang tahan terhadap suhu tinggi. Enzim yang tahan terhadap suhu tinggi dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik yang disebut dengan enzim termostabil. Untuk itu maka enzim dari mikroorganisme tersebut kemungkinan dapat digunakan pada industri yang umumnya menggunakan temperatur tinggi pada proses produksinya.

Selama ini, protease yang banyak digunakan dalam industri bersumber dari mesofil dan bersifat termolabil. Penggunaan protease mesofilik dalam industri memiliki kelemahan, enzim ini aktif menghidrolisis substrat pada rentang temperatur 10°-45°C, di atas temperatur 50°C, enzim dapat rusak dan kehilangan aktivitas katalitiknya. Padahal sebagian besar industri pada proses produksinya menggunakan temperatur tinggi seperti pada industri deterjen [4] dan proses *dehairing* dalam industri kulit [6].

Enzim termostabil memiliki beberapa keuntungan, diantaranya yaitu meminimalkan risiko kontaminan, tahan terhadap kondisi stress seperti zat-zat kimia lain dan pH lingkungannya serta dapat meningkatkan kecepatan reaksi-reaksi biokimianya [7]. Oleh karena itu, enzim termostabil memiliki nilai ekonomis yaitu stabil selama penyimpanan yang akan mengurangi biaya produksi sehingga sangat menguntungkan bila digunakan dalam suatu proses industri yang kebanyakan melibatkan panas dan zat-zat kimia lain.

Habitat mikroorganisme termofilik biasanya adalah tempat-tempat yang berhubungan dengan kegiatan geotermal seperti daerah kawah gunung berapi, sumber air panas dan daerah ekstrim lainnya. Protease termostabil dapat diisolasi dari mikroorganisme yang hidup pada daerah bersuhu tinggi dengan kisaran temperatur antara 45°-100°C atau lebih. Agustini [8] berhasil mengisolasi *B.*

caldoxylolyticus berasal dari sumber air panas Cangar, Batu Malang yang memiliki temperatur optimum 80°C dengan aktivitas enzim sebesar 0,6 U/mL. Bakteri termofilik ekstraselular penghasil protease *Brevibacillus sp* juga berhasil diisolasi dari tiga sumber air panas di Indonesia oleh Wang, *et al.* [9] yang memiliki aktivitas optimal pada suhu 70°C dengan aktivitas maksimum protease 26,54 U/mL.

Isolat P5-a berhasil diisolasi oleh Zilda, dkk. [10] dari sumber air panas Tambarana yang memiliki aktivitas optimum pada 50°C sedangkan pada penelitian selanjutnya, Zilda, dkk. [11] berhasil mendapatkan isolat *Brevibacillus thermoruber* yang mempunyai suhu optimum 85°C. Wilson & Zvauya [12] berhasil mengisolasi bakteri termofilik penghasil protease EP1001 yang diisolasi dari sumber air panas di Chimanmani, Zimbabwe yang memiliki aktivitas optimal pada 75°C. Al-Qodah, *et al.* [13] berhasil mengisolasi *Bacillus pumilus* dari sumber air panas di Jordan yang memiliki suhu optimal 60°C.

Isolasi bakteri penghasil protease termostabil dapat dilakukan dengan melakukan penapisan (*screening*). Pada penelitian ini, akan dilakukan *screening* untuk mengisolasi bakteri proteolitik dari sumber air panas Singgahan, Tuban. Bakteri proteolitik yang didapatkan kemudian akan diuji aktivitas proteolitiknya. Penelitian ini mengambil lokasi di sumber air panas Singgahan, Tuban karena merupakan salah satu daerah geotermal yang memiliki kemungkinan ditemukannya mikroorganisme penghasil protease termostabil karena suhunya dapat mencapai 56°C. Selain itu, penelitian mengenai isolasi enzim protease dari sumber air panas Singgahan, Tuban masih minim dilakukan. Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui keragaman dari bakteri proteolitik termostabil yang berasal dari tempat-tempat yang berhubungan dengan kegiatan geotermal terutama dari sumber air panas di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah *shaker*, mikropipet (Transferpette S), *autoklaf* (Hirayama), *laminar flow* (Thermo

Scientific), Spektrofotometer UV-Vis (shimadzu 1800), refrigerator (Haier), digital vortex mixer (VWR), sentrifuse (Eppendorf), inkubator (memmert), mikroskop (Olympus), botol semprot, aluminium foil, plastik wrap, timbangan dan peralatan gelas.

Bahan

Penelitian ini menggunakan media Luria Bertani yang terdiri dari *yeast extract* (DifcoTM), NaCl (Merck), tripton (DifcoTM), media *skim milk* agar menggunakan agar (Criterion) dan *skim milk* (DifcoTM), media *screening* cair menggunakan K₂HPO₄ (Merck), MgSO₄·7H₂O (Merck), kasein (Oxoid), *yeast extract* (DifcoTM), NaCl (Merck). Pembuatan buffer fosfat menggunakan NaH₂PO₄ (Merck) dan Na₂HPO₄·7H₂O (Merck), sedangkan untuk uji aktivitas proteolitik menggunakan kasein (Oxoid), buffer fosfat, asam trikloroasetat (TCA), Na₂CO₃ (Merck), Tirosin (Merck) dan Folin-Ciocalteu. Pewarnaan Gram menggunakan kristal ungu (Cahaya Kimia) iodine (Shindo), safranin (Cahaya Kimia) dan alkohol (Shindo).

PROSEDUR PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap yang meliputi: isolasi dan *screening* bakteri termofilik penghasil protease, produksi enzim protease dan pengukuran aktivitas enzim.

Isolasi dan *Screening* Bakteri Termofilik Penghasil Protease

Isolasi mikroorganisme dari sumber air panas Singgahan dilakukan dengan cara berikut : 1 mL sampel diinokulasikan kedalam 9 mL media Luria Bertani (LB) cair secara aseptik dan dishaker selama 18 jam pada suhu 53°C. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya perubahan pada media cair yang awalnya jernih berubah menjadi keruh.

200 µL media LB cair yang telah keruh kemudian dituang pada media padat dan diinkubasi pada suhu 53°C selama 24 jam. Koloni tunggal yang diperoleh selanjutnya digoreskan di LB padat dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 53°C. Koloni yang telah didapatkan kemudian di

uji kemurniannya dengan uji morfologi dan pewarnaan Gram.

Koloni-koloni tunggal yang diperoleh diinokulasi kembali dalam media *skim milk agar*. Selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 53°C. Zona bening disekitar koloni menandakan adanya aktivitas bakteri penghasil protease. Selanjutnya diukur diameternya dan ditentukan Indeks Proteolitik (IP). Nilai indeks proteolitik didapatkan dengan cara membagi diameter zona bening dengan diameter zona pertumbuhan bakteri [8]. Bakteri proteolitik yang diperoleh kemudian diukur ketahanan suhunya pada suhu 55-85°C dengan kecepatan 175 rpm selama 18 jam.

Produksi Enzim Protease

Isolat yang memiliki indeks proteolitik tertinggi kemudian ditumbuhkan pada 6 mL media *screening* cair (0,1% NaCl, 0,1% K₂HPO₄, 0,01% MgSO₄·7H₂O, 0,05% *yeast extract* dan 2% kasein), kemudian dishaker pada suhu 53°C dengan kecepatan 175 rpm selama 18 jam dan disentrifus pada 5.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipisahkan dan digunakan untuk mengukur aktivitas protease.

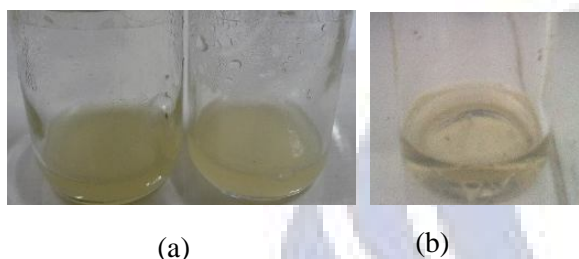
Pengukuran Aktivitas Enzim

Aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan cara yang dilakukan dalam Badriyah & Izzatul [15]. Sebanyak 0,5 ml larutan enzim ditambahkan dengan 0,5 ml larutan 0,05 M buffer fosfat pH 7 dan preinkubasikan selama 5 menit, selanjutnya tambahkan 0,5 ml substrat (2% kasein dalam 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7), Campuran diinkubasikan selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml 0,4 M asam trikloroasetat (TCA), yang selanjutnya disentrifugasi untuk diambil supernatannya. Sebanyak 0,5 ml supernatan ditambah dengan 2,5 ml 0,5 M natrium karbonat, preinkubasikan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu (1:2) dan inkubasikan ulang selama 30 menit dan ditentukan Absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan *Screening* Bakteri Termofilik Penghasil Protease

Isolasi bakteri dari sumber air panas, Singgahan, Tuban dilakukan dengan menggunakan media Luria Bertani dan diinkubasi pada suhu 53°C. Suhu tinggi (53°C) digunakan agar bakteri yang terisolasi merupakan bakteri yang memiliki aktivitas optimum dan stabilitas tinggi pada suhu tinggi. Bakteri yang tumbuh ditunjukkan dengan adanya kekeruhan pada media LB cair (Gambar 1).



Gambar 1. a. Media LB Sampel (Keruh).
b. Media LB control (Jernih).

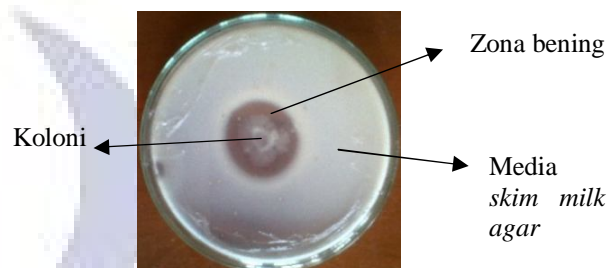
Isolasi bakteri proteolitik dari sumber air panas juga telah dilakukan oleh Agustini di sumber air panas Cangar, Batu Malang [8], Wang, *et al* di sumber air panas Pantai Cermin, Kalianda dan Banyu Wedang [10], Zilda, dkk di sumber air panas Tambarana [11] di sumber air panas Padang Cermin dan Banyu Wedang [12], Wilson & Zvauya di sumber air panas alkali, Zimbabwe [13] dan Al-Qodah di sumber air panas Mae'en, Jordan [14].

Media yang keruh kemudian ditumbuhkan pada media LB padat dengan cara *pour plate*. Isolat yang tumbuh dengan perbedaan warna, ukuran dan bentuk selanjutnya dipilih dan dimurnikan dengan cara *digores* pada LB padat steril.

Screening bakteri proteolitik termofilik dilakukan pada 75 isolat yang diperoleh dengan kode ST-1 sampai ST-75 dengan menggunakan media *skim milk* 6%. Diantara 75 isolat yang telah didapatkan, diperoleh 27 isolat yang berpotensi sebagai bakteri proteolitik termofilik yang ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni. 27 isolat tersebut adalah ST-1, ST-4, ST-9, ST-10, ST-15, ST-17, ST-18, ST-27, ST-28, ST-30, ST-

31, ST-32, ST-33, ST-34, ST-37, ST-38, ST-41, ST-46, ST-53, ST-54, ST-57, ST-59, ST-63, ST-64, ST-66, ST-71, ST-75 (Tabel 1).

Zona bening yang terbentuk menjadi indikator bahwa bakteri yang diidentifikasi merupakan penghasil protease karena mampu merombak kasein dalam media *skim milk* menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut (Gambar 2). *Skim milk* dipilih sebagai media karena kandungan lemak pada susu *full cream* menghambat pertumbuhan media.



Gambar 2. Zona Bening disekitar Koloni yang Menunjukkan Aktivitas Bakteri Proteolitik

Dari hasil uji aktivitas proteolitik secara kualitatif diperoleh 6 isolat yang menunjukkan zona jernih relatif besar dibandingkan isolat lainnya. ST-30 dengan nilai IP sebesar 9 dengan membandingkan diameter dari zona bening dengan diameter koloni dan ST-28, ST-33, ST-53, ST-57, ST-75 dengan nilai IP sebesar 5. Perbedaan nilai IP pada 27 isolat yang dihasilkan disebabkan karena adanya perbedaan aktivitas antara satu isolat dengan isolat yang lainnya.

Nilai IP yang dihasilkan pada 7 isolat diatas, lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai IP yang dihasilkan oleh isolat CG-10 (3.3) [9], P5-a (2.83) [11], T3S2 (2) [17] dan LII (4) [12] dan lebih rendah jika dibandingkan dengan isolat PLI-1 (10.3) [10] dan BII (12.5-15.5) [12].

Nilai IP bukan satu-satunya indikator untuk memperoleh protease termostabil. Indikator dari bakteri protease termostabil adalah kemampuan isolat untuk memproduksi protease yang mempunyai suhu optimum dan stabil pada suhu tinggi.

Isolat	Bakteri Proteolitik dan IP	Isolat	Bakteri Proteolitik dan IP	Isolat	Bakteri Proteolitik dan IP	Isolat	Bakteri Proteolitik dan IP	Isolat	Bakteri Proteolitik dan IP
ST-1	√(3.5)	ST-16	-	ST-31	√(3.5)	ST-46	√(3.67)	ST-61	-
ST-2	-	ST-17	√(4)	ST-32	√(3)	ST-47	-	ST-62	-
ST-3	-	ST-18	√(4)	ST-33	√(5)	ST-48	-	ST-63	√(2.5)
ST-4	√(4)	ST-19	-	ST-34	√(4)	ST-49	-	ST-64	√(2.5)
ST-5	-	ST-20	-	ST-35	-	ST-50	-	ST-65	-
ST-6	-	ST-21	-	ST-36	-	ST-51	-	ST-66	√(3)
ST-7	-	ST-22	-	ST-37	√(3)	ST-52	-	ST-67	-
ST-8	-	ST-23	-	ST-38	√(3)	ST-53	√(5)	ST-68	-
ST-9	√(3)	ST-24	-	ST-39	-	ST-54	√(2)	ST-69	-
ST-10	√(1.8)	ST-25	-	ST-40	-	ST-55	-	ST-70	-
ST-11	-	ST-26	-	ST-41	√(2)	ST-56	-	ST-71	√(4)
ST-12	-	ST-27	√(3)	ST-42	-	ST-57	√(5)	ST-72	-
ST-13	-	ST-28	√(5)	ST-43	-	ST-58	-	ST-73	-
ST-14	-	ST-29	-	ST-44	-	ST-59	√(4)	ST-74	-
ST-15	√(2)	ST-30	√(9)	ST-45	-	ST-60	-	ST-75	√(5)

Tabel 1. Hasil Isolasi dan *Screening* Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Singgahan, Tuban.

Oleh karena itu, langkah selanjutnya dari proses *screening* adalah menumbuhkan 6 isolat penghasil protease yang memiliki zona jernih relatif lebih besar dibandingkan isolat lainnya pada suhu 55-85°C.

Berdasarkan percobaan terhadap ketahanan suhu, 6 isolat penghasil protease dapat tumbuh pada suhu tinggi antara 75-80°C. Suhu tersebut jauh diatas suhu lingkungan alami organisme ini hidup, yaitu 56°C. ST-30 mampu tumbuh sampai suhu 75°C sedangkan ST-28, ST-33, ST-53, ST-57 dan ST-75 mampu tumbuh baik sampai suhu 80°C (Tabel 2). Kemampuan 6 isolat tumbuh pada suhu 75-80°C membuktikan bahwa keenam isolat tersebut terbukti mampu bertahan sampai pada suhu tinggi

Tabel 2. Ketahanan bakteri proteolitik pada berbagai macam varians suhu

Isolat	75°C	80°C	85°C
ST-28	√	√	-
ST-30	√	-	-
ST-33	√	√	-
ST-53	√	√	-
ST-57	√	√	-
ST-75	√	√	-

Pengukuran Aktivitas Enzim

6 isolat yang memiliki indeks proteolitik tertinggi (9-5) dan terbukti mampu tumbuh pada suhu tinggi (75-80°C) kemudian diukur aktivitas enzimnya. Konsentrasi tirosin ditentukan berdasarkan kurva standart tirosin. Kurva standart dibuat dari larutan standart tirosin dengan konsentrasi 10-100 ppm.

Tabel 3. Aktifitas Kuantitatif Bakteri Proteolitik

Isolat	Aktivitas (U/mL)
ST-28	0,2050
ST-30	0,2522
ST-33	0,1963
ST-53	0,1980
ST-57	0,2059
ST-75	0,1909

Hasil pengujian aktivitas protease dari tujuh isolat terpilih menunjukkan 6 isolat memiliki aktivitas protease secara kuantitatif yang berbeda. 2 isolat yang memiliki aktivitas terbesar yaitu isolat ST-30 memiliki aktivitas kuantitatif sebesar 0.2522 U/mL dan ST-57 memiliki aktivitas kuantitatif 0.2059 U/mL (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan nilai aktivitas enzim secara kualitatif, melalui nisbah diameter zona bening dengan diameter koloni dimana ST-30 memiliki nilai indeks proteolitik yang lebih besar dibandingam ST-57. Nilai aktifitas kuantitatif pada penelitian ini, tidak diketahui waktu pertumbuhan optimumnya.

Beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab nilai aktivitas kuantitatif setiap isolat berbeda adalah perbedaan jenis mikroorganisme sehingga menyebabkan perbedaan aktivitas yang dimiliki oleh setiap isolat dan perbedaan kecepatan pertumbuhan setiap isolat.

PENUTUP

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. ST-30 memiliki aktivitas kualitatif yang dinyatakan dengan indeks proteolitik sebesar 9.
2. ST-30 memiliki aktivitas kuantitatif sebesar 0.2520 U/mL.

Saran

Dari hasil penelitian ini hal-hal yang dapat disarankan adalah sebagai berikut:

1. Pengukuran aktivitas protease harus dilakukan pada kondisi optimum.
2. Untuk keperluan aplikasi, harus dilakukan pengujian stabilitas enzim, pH, suhu dan inhibitor.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sadikin, Mohamad. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta : Widya Medika
2. Singh, Shailendra. 2007. *A Textbook of Enzym*. New Delhi: Campus Books International.
3. Mahajan, R. T. dan Shamkant, B.B.. 2010. Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review, *India J. Pharm., Research*, 3(9): 2048-2068.
4. Kamoun, Sellami, Haddar A, Nel-H, Ali, Frikha, Ghorbel, Kanoun, Nasri. 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations, *Microbiological Research*, 163(3):299-306
5. Madhavi, Jatavathu, Srilakshmi, Jatavathu, Rao, M. V. Raghavendra, Rao, K. R. S. Sambasiva. 2011. Efficient Leather Dehairing by Bacterial Thermostable Protease. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 3(4).
6. Frock, Andrew D. dan Kelly, Robert M. 2012. Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme Biocatalysis, *Current Opinion in Chemical Engineering, Rev*, 1:1-10.
7. Agustini, Rudiana. 2003. *Karakterisasi dan Amobilisasi Protease Mikroorganisme Termofilik Isolat CG-10 yang Hidup di Sumber Air Panas Cangar, Jawa Timur dengan Matriks Pendukung Bentonit. Disertasi yang tidak dipublikasikan*. Surabaya: Universitas Airlangga.
8. Agustini, Rudiana. 2006. Pemanfaatan Protease Termofilik yang Hidup di Sumber Air Panas Cangar Batu Malang. *Indo. J. Chem.*, 6(2): 205 – 211.
9. Wang, Shuai, Xuezheng, Lin, Xiaohang, Huang, Li, Zheng, Zilda, Dewi Seswita. 2012. Screening and Characterization of the Alkaline Protease Isolatd from PL-1, a Strain of *Brevibacillus* sp Collected from Indonesia's Hot Spring. *Journal of ocean University of China*, 11(2): 213-218.
10. Zilda, Dewi Seswita, Kusumarini, Atria, Chasanah, Ekowati. 2008. Penapisan dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Termo-Asidofilik P5-a dari Sumber Air Panas Tambarana. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 3(2).
11. Zilda, Dewi Seswita, Harmayani, Eni, Widada, Jaka, Asmara, Widya, Irianto, Hari Eko, Patantis, Gintung, Fawzya, Yusro Nuri. 2012. Penapisan Mikroorganisme Penghasil Protease Tahan Panas yang Diiisolasi dari Sumber Air Panas Indonesia. *Squalen*, 7(3): 105-114.
12. Wilson, Parawira, Zvauya, Remigio. 2012. Production and Characterisation of Protease Enzyme Produced by a Novel Moderate Thermophilic Bacterium (EP1001) Isolatd from an Alkaline Hot Spring, Zimbabwe. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27): 5542-5551.
13. Al-Qodah, Hala, Daghistani, Kholoud, Alananbeh. 2013. Isolation and Characterization of Thermostable Protease Producing *Bacillus pumilus* from Thermal Spring in Jordan. *African Journal of Microbiology Research*, 7(29): 3711-3719.
14. Badriyah, Baital, Izzatul, Ardyati, Tri. 2013. Deteksi Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri Asal Ampas Tahu pada Substrat Bekatul, *Jurnal Biotropika*, 1(3): 109-113.
15. Baehaki, Ace, Budiman, Arief. 2011. Isolasi dan Karakterisasi dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 22(1).