

SCREENING BAKTERI PROTEOLITIK TERMOFILIK DARI SUMBER AIR PANAS SINGGAHAN TUBAN

SCREENING PROTEOLYTIC THERMOPHILIC BACTERIA FROM HOT SPRINGS SINGGAHAN TUBAN

Dian Novalia Yuanita S. P.* 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: chemiss_dianov8@yahoo.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan screening bakteri proteolitik termofilik dari sumber air panas Singgahan Tuban. Isolasi dilakukan menggunakan media Luria Bertany dan screening dilakukan menggunakan media agar skim milk 6%. Indeks Proteolitik (IP) bakteri ditentukan dengan membandingkan diameter zona bening dan diameter zona pertumbuhan koloni. IP yang relatif besar dipilih untuk diproduksi dan ditentukan aktivitas proteolitiknya menggunakan media yang mengandung kasein 2%. Pengukuran aktivitas enzim protease menggunakan reagen Follin Ciocalteu, yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Hasil screening menunjukkan bahwa dari 76 isolat bakteri yang diperoleh, 28 isolat diantaranya mampu menghasilkan protease. Isolat dengan kode ST-57 memiliki IP dan aktivitas terbesar yaitu 7,0, dan 0,2489 Unit/mL.

Kata kunci: Bakteri proteolitik termofilik, indeks proteolitik, aktivitas enzim protease

Abstract. This research aimed to screening proteolytic thermophilic bacteria from hot springs Singgahan Tuban. Isolation was done Luria Bertany medium and screening was done by using 6% skim milk agar medium. Proteolytic index (IP) bacteria determined by comparing the diameter of clear zone and colony growth diameter of the growth zone. The big IP was chosen for being produce and to determine the proteolytic activity using casein 2 % as a medium. Enzymes from proteolytic bacteria isolate then produced and measured it proteolytic activity used medium containing 2% casein. Enzyme activity test used Follin Ciocalteu reagent, measured with UV-Vis spectrophotometer at 750 nm. Screening yield from 76 isolates, 28 isolates able to produce proteases. Isolates with code ST-57 had an IP and the greatest activity 7.0, and 0.2489 Units/mL.

Keywords: Proteolytic thermophilic bacteria, proteolytic index, protease enzyme activity

PENDAHULUAN

Mikroorganisme termofilik tumbuh baik pada lingkungan dengan temperatur tinggi, seperti daerah gunung berapi dan sumber air panas. Mikroorganisme termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil dibandingkan yang berasal dari hewan dan tumbuhan. Hal ini dikarenakan

mikroorganisme dapat diproduksi dalam jumlah yang besar dan prosedur pemisahan yang relatif sangat sederhana [1]. Terdapat kurang lebih 20 kelompok penelitian di U.S., Jepang, Jerman saat ini aktif mencari mikroorganisme yang hidup di lingkungan ekstrem termasuk termofilik [2]. Hal ini dikarenakan

mikroorganisme termostabil mempunyai aktivitas dengan ketahanan yang baik bila bekerja pada suhu yang relatif tinggi, begitu juga terhadap kondisi stress seperti zat-zat kimia lain dan pH lingkungannya, sehingga sangat menguntungkan bila digunakan dalam suatu proses industri yang kebanyakan melibatkan panas dan zat-zat kimia [3] [4].

Enzim yang mempunyai nilai ekonomi yang tinggi dalam bidang industri baik pangan maupun non pangan salah satunya adalah enzim protease dan total jumlah enzim dari protease mikroba yang dijual di seluruh dunia mencapai 40% [5]. Enzim proteolitik merupakan salah satu jenis enzim terbesar yang menguasai sekitar 60% dari total pemasaran enzim dunia, secara komersial telah banyak diproduksi dan dipasarkan oleh banyak perusahaan di dunia [6]. Protease yang digunakan dalam industri yaitu protease serin dari *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. lichenformis*, *Bacillus* alkali *B. lentus* digunakan didalam detergen [6], protease *Mucor* dalam pengolahan keju [7], protease *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* dalam proses penyamakan kulit [8], dan protease *Aspergillus oryzae* dalam pengolahan roti [7].

Di Indonesia banyak ditemukan lingkungan ekstrem, misalnya: kawah gunung berapi dan sumber air panas. Ada beberapa sumber air panas yang terdapat di Indonesia [9], misalnya: Cangar Batu Malang [10], Sungai Medang Jambi [11], Tambarana Sulawesi [12], Poso [13], Sipoholon Tapanuli Utara [14], Tanjung Sakti Lahat [15], dan Singgahan Tuban. Hasil penelitian yang telah dilakukan terdahulu, ditemukan beberapa koloni bakteri termofilik yang mampu menghasilkan protease ekstraseluler yang ditandai dengan pembentukan zona bening di sekeliling koloni sel.

Penelitian mikroorganisme penghasil protease termostabil yang telah dilakukan adalah isolat CG-10 dengan IP sebesar 3,3 dan aktivitas proteolitik sebesar 0,6 U/mL [10], isolat MI_{2.1} dengan IP 7,89 dan aktivitas

proteolitik sebesar 0,712 U/mL [11], isolat SP2 dengan IP 5,96 dan aktivitas proteolitik sebesar 9,93 Unit [14], isolat P7-2 dengan IP sebesar 1,43 dan aktivitas proteolitik sebesar 0,245 U/mL [13], isolat T3S2 dengan IP sebesar 2,0 dan aktivitas proteolitik 0,385 U/mL [16].

Sumber air panas Singgahan Tuban merupakan salah satu daerah geotermal yang memiliki kemungkinan ditemukannya mikroorganisme penghasil protease termostabil, karena memiliki suhu antara 52-55 °C, dengan interval pH 7. Sumber air panas Singgahan berada di Kota Tuban, Provinsi Jawa Timur. Mikroorganisme yang ada di sumber air panas Singgahan Tuban khususnya pemanfaatan enzim protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut belum pernah diteliti. Oleh karena itu, dilakukan upaya mendapatkan enzim protease yang tahan terhadap suhu yang tinggi yaitu dengan *screening* mikroorganisme termofilik penghasil enzim protease dari sumber air panas Singgahan Tuban.

METODE PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Shaker*, termometer, mikropipet (Eppendorf research plus), *autoclave* (Hirayama HVE 50), *laminar air flow* (Thermo scientific 1300 series A2), pH meter (Eutech), mikroskop (Olympus), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800), inkubator (Memmert), timbangan (Ohaus), sentrifuse dingin (Eppendorf 5810R), sentrifus (Hettich, EBA 20), digital vortex mixer (VWR), dan peralatan gelas.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel air yang diambil secara aseptik dari sumber air panas Singgahan Tuban. Media yang digunakan untuk isolasi, pemurnian, dan ketahanan suhu yaitu *Luria Bertany* (LB) yang terdiri dari *yeast extract* (DifcoTM), NaCl (Merck), tripton (Difco) dan *Luria Bertany Agar* (LA) yang terdiri dari *yeast*

extract (Difco™), NaCl (Merck), tripton (Difco™) dan agar (Criterion). Media *screening* terdiri dari *skim milk* (Difco™) dan agar (Criterion). Media produksi protease dan pengukuran aktivitas enzim terdiri dari kasein (Oxoid), NaCl (Merck), K_2HPO_4 (Merck), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), *yeast extract* (Difco™), NaH_2PO_4 (Merck), $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), asam tricloroasetat (TCA), Na_2CO_3 (Merck), reagen *Follin Ciocalteu*.

PROSEDUR PENELITIAN

Isolasi dan *Screening* Mikroorganisme dari Sumber Air Panas

Sampel air yang telah diambil secara aseptik dari beberapa titik di sumber air panas Singgahan Tuban dicampur hingga homogen, lalu sebanyak 1 mL sampel diinokulasikan kedalam tabung yang berisi 9 mL media LB kemudian di *shaker* selama 24 jam pada suhu 53 °C. Diambil sebanyak 100 µL media LB yang mengandung bakteri, kemudian ditumbuhkan pada media LA dengan teknik *pour plate*, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 53 °C. Koloni campuran bakteri yang berbeda warna, bentuk, dan ukuran yang tumbuh pada media LA dianggap mewakili biakan murni dari satu mikroorganisme [17]. Masing-masing koloni kemudian dimurnikan dengan metode gores pada media LA yang baru dan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 53 °C. Inokulasi dilakukan terus menerus hingga didapatkan koloni tunggal yang selanjutnya dilakukan uji ketahanan suhu dengan media LB.

Isolat-isolat koloni tunggal yang diperoleh pada tahap isolasi, dipindahkan ke media *screening* padat yang mengandung 6% *skim milk* dan 2% agar dengan cara ditusuk, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 53 °C. Isolat bakteri yang menghasilkan protease ditandai dengan adanya areal bening disekitar koloni yang selanjutnya diukur nilai indeks proteolitik (IP), yaitu nilai ratio diameter zona bening dan diameter zona pertumbuhan bakteri. Isolat bakteri termofilik yang menghasilkan

protease selanjutnya diproduksi proteasenya untuk ditentukan aktivitas enzim.

Produksi Protease dan Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

Produksi Protease

Produksi protease dilakukan dengan menumbuhkan sebanyak 1 ose inokulum isolat bakteri proteolitik ke dalam 3 mL media *screening* cair dengan komposisi NaCl 0,1%, K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%, *yeast extract* 0,05% dan *kasein* 2% dan selanjutnya di *shaker* pada suhu 53 °C dengan kecepatan 175 rpm selama 18 jam, kemudian disentrifus dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan merupakan enzim protease kasar dan selanjutnya diuji aktivitasnya dengan metode Badriyah dan Ardyati [18].

Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

Prosedur pengujian aktivitas protease adalah: sebanyak 0,5 mL larutan enzim ditambahkan dengan 0,5 mL larutan 0,05 M buffer fosfat pH 7. Suspensi dipreinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit dan ditambahkan 0,5 mL substrat (2% kasein dalam 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7). Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1 mL asam trikloroasetat (TCA) 0,4 M dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan diambil sebanyak 0,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2,5 mL Na_2CO_3 0,5 M, kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen *Follin Ciocalteu* dan inkubasikan ulang selama 30 menit, setelah itu diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Aktivitas enzim protease ditentukan dengan menginterpolasikan nilai absorbansi kedalam persamaan regresi dari kurva standar tirosin yang didapatkan. Blanko dibuat dengan cara yang sama, namun enzim dinaktifkan dahulu [18]. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai

jumlah enzim yang mampu menghidrolisis kasein menghasilkan peptida yang ekuivalen dengan 1 μmol produk tirosin per menit pada kondisi optimum pengukuran [16].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan *Screening* Mikroorganisme dari Sumber Air Panas

Hasil isolasi dan *screening* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Isolasi, Ketahanan Suhu dan *Screening* Bakteri Termofilik asal Singgahan Tuban

Isolat	Suhu (°C)	Bakteri Proteolitik & Indeks Proteolitik	Isolat	Suhu (°C)	Bakteri Proteolitik & Indeks Proteolitik	Isolat	Suhu (°C)	Bakteri Proteolitik & Indeks Proteolitik	Isolat	Suhu (°C)	Bakteri Proteolitik & Indeks Proteolitik
ST-1	80	-	ST-20	80	-	ST-39	70	-	ST-58	75	+(4,0)
ST-2	75	+(3,0)	ST-21	80	-	ST-40	80	-	ST-59	75	-
ST-3	80	-	ST-22	80	-	ST-41	80	-	ST-60	80	-
ST-4	75	+(3,0)	ST-23	80	-	ST-42	80	-	ST-61	80	-
ST-5	80	+(4,0)	ST-24	80	-	ST-43	80	+(3,0)	ST-62	80	-
ST-6	80	+(4,0)	ST-25	80	-	ST-44	80	+(4,0)	ST-63	80	-
ST-7	80	-	ST-26	80	-	ST-45	70	-	ST-64	80	+(4,5)
ST-8	80	-	ST-27	80	+(5,0)	ST-46	70	-	ST-65	80	-
ST-9	80	-	ST-28	80	-	ST-47	80	+(1,5)	ST-66	80	+(3,0)
ST-10	80	-	ST-29	70	-	ST-48	75	-	ST-67	75	+(3,0)
ST-11	80	-	ST-30	80	-	ST-49	75	-	ST-68	80	-
ST-12	80	-	ST-31	80	+(4,0)	ST-50	80	-	ST-69	80	-
ST-13	80	-	ST-32	80	+(4,5)	ST-51	80	+(1,5)	ST-70	80	-
ST-14	70	-	ST-33	80	-	ST-52	80	+(6,0)	ST-71	80	+(2,33)
ST-15	80	+(5,0)	ST-34	80	+(2,5)	ST-53	70	+(2,0)	ST-72	80	-
ST-16	80	-	ST-35	80	+(1,5)	ST-54	80	+(4,0)	ST-73	80	-
ST-17	80	+(6,0)	ST-36	80	+(3,0)	ST-55	80	+(2,0)	ST-74	80	-
ST-18	80	+(2,0)	ST-37	80	+(5,0)	ST-56	75	-	ST-75	80	-
ST-19	80	-	ST-38	80	-	ST-57	75	+(7,0)	ST-76	80	-

Tabel 1 menunjukkan bahwa 76 isolat bakteri telah berhasil diisolasi dari sumber air panas Singgahan Tuban, dengan ketahanan suhu sekitar 70-80 °C. Bakteri termofilik dapat bertahan hidup pada suhu 50 °C dan lebih [19]. Beberapa bakteri termofilik berhasil diisolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia, seperti *Saccharococcus* dengan kisaran suhu pertumbuhan 78 °C dari sumber air panas Tanjung Sakti Lahat [15]. *B. caldophilolyticus* dengan kisaran suhu pertumbuhan 80 °C dari sumber air panas Cangar Batu Malang [10]. *Brevibacillus thermoruber* dengan kisaran suhu pertumbuhan 85°C dari sumber air panas Indonesia [9]. Keberadaan bakteri termofilik pada sumber air panas ini disebabkan kondisi lingkungan sumber air panas yang mendukung kehidupan bakteri tersebut [19].

Hasil *screening* dengan media *skim milk* menunjukkan bahwa 28 isolat bakteri termofilik yang mengindikasikan bersifat proteolitik dengan ditandai terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri pada media *skim milk* (Gambar 1). Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dikarenakan enzim protease yang dihasilkan dari bakteri proteolitik tersebut telah mampu mendegradasi substrat yang

mengandung kasein yang terdapat pada media *skim milk*. Kasein terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino yang larut [20].



Gambar 1. Isolat Bersifat Proteolitik

Sedangkan untuk 48 isolat lainnya tidak mengindikasikan sifat proteolitik dengan ditandai tidak adanya zona bening disekitar koloni. Hal ini mungkin disebabkan ketidakcocokan antara substrat kasein yang ada pada media *skim milk* dengan protease yang dihasilkan oleh isolat tersebut atau isolat tersebut tidak menghasilkan enzim protease.

Hasil pengukuran indeks proteolitik menunjukkan bahwa 28 isolat bakteri termofilik memiliki indeks proteolitik berkisar antara 1,5-7,0 dan isolat bakteri dengan indeks

proteolitik terbesar yaitu dimiliki oleh isolat ST-57. Beberapa bakteri termofilik berhasil diisolasi dan diperoleh nilai indeks proteolitik, seperti isolat CG-10 sebesar 3,3 [10], isolat MI_{2,1} sebesar 7,89 [11], isolat CW 3-16 sebesar 3,60 [7], isolat SP2 sebesar 5,96 [14], isolat P7-2 sebesar 1,43 [13], isolat T3S2 sebesar 2,0 [17], isolat TA3 sebesar 0,77 [15], isolat P5-a sebesar 2,83 [12]. Penyebab tidak samanya nilai aktivitas hidrolisis diduga karena beberapa faktor yaitu perbedaan jenis mikroorganisme, kecepatan pertumbuhan setiap isolat pada medium, dan tipe enzim yang dihasilkan.

Produksi Protease dan Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

Produksi enzim dilakukan pada jam ke-18 pertumbuhan, dimana pada jam tersebut isolat bakteri biasanya mencapai fase log yaitu fase pertumbuhan maksimal bakteri sehingga dapat menghasilkan jumlah *crude enzyme* yang optimum. Fase log pertumbuhan adalah fase aktif sel dimana terjadi penambahan jumlah sel yang berlangsung terus menerus sampai terjadinya fase stasioner [2]. Penelitian terdahulu, seperti isolat P5-a memiliki fase log yang cukup lama, yakni dari jam ke-6 sampai jam ke-15 inkubasi [12]. Isolat TP5K1 menunjukkan fase logaritmik sampai jam ke-16 [18].

Uji aktivitas proteolitik hanya dilakukan pada 5 isolat dengan nilai indeks proteolitik terbesar. Hasil aktivitas proteolitik terbesar adalah isolat dengan kode ST-57 dengan aktivitas sebesar 0,2489 Unit/mL (Tabel 2).

Tabel 2. Aktivitas Bakteri Proteolitik asal Singgahan Tuban

Isolat	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (λ=750 nm)	Aktivitas Proteolitik (Unit/mL)
ST-57	90.231	0,975	0,2489
ST-17	89.818	0,971	0,2476
ST-52	79.575	0,872	0,2196
ST-15	73.683	0,814	0,2032
ST-37	73.053	0,808	0,2015

Beberapa bakteri termofilik berhasil diisolasi dan diperoleh aktivitas proteolitik, seperti isolat CG-10 sebesar 0,6 U/mL [10], isolat MI_{2,1} sebesar 0,712 U/mL [11], isolat SP2 sebesar 9,93 Unit [14], isolat P7-2 sebesar

0,245 U/mL [13], isolat T3S2 sebesar 0,385 U/mL [16], 1,1170 U/mL [20]. Perbedaan aktivitas enzim dari masing-masing penelitian dikarenakan jumlah enzim dan asam amino protein enzim yang dihasilkan masing-masing isolat berbeda satu sama lainnya. Hal ini diduga karena beberapa faktor yaitu perbedaan jenis mikroorganisme, kecepatan pertumbuhan setiap isolat pada medium, dan tipe enzim yang dihasilkan.

PENUTUP

Simpulan

Hasil *screening* bakteri proteolitik termofilik dari sumber air panas Singgahan Tuban, diperoleh 76 isolat bakteri dan 28 isolat diantaranya mampu menghasilkan protease dengan indeks proteolitik berkisar antara 1,5-7,0 dan ketahanan suhu sekitar 70-80 °C. Isolat bakteri dengan indeks proteolitik terbesar yaitu isolat ST-57, dengan nilai indeks 7,0, tahan sampai suhu 75 °C, dan aktivitas enzim sebesar 0,2489 Unit/ml.

Saran

Perlu dikaji lebih lanjut tentang kondisi optimum aktivitas bakteri proteolitik dan identifikasi bakteri isolat ST-57 dari sumber air panas Singgahan Tuban.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini telah dibimbing dan didanai oleh Dr. Aline Puspita Kusumadjaja, M. Si.

DAFTAR PUSTAKA

1. Singh, Shailendra. 2007. *A Text Book of Enzyme*. New Delhi: Kampus Book Internasional.
2. Madigan, Michael, T., dan Mairs, BL. 1997. *Extremophiles*. *Sci Am*. Vol. 276.
3. Sadikin, Mohamad. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta: Widya Medika.
4. Candra, Krishna Purnawan. 2005. Telaah Pengklonan Gen Protease dari *Bacillus Stearothermophilus* ke dalam *Escherichia*

- coli. Jurnal Teknologi Pertanian.* 1(1): 35-42.
5. Gupta R, Beg QK & Lorenz P. 2002. Bakterial alkalin protease: *Molecular approach and industrial application. Mini review. Spinger-Verlag 2002. Microbiol. Biotechnol.* 59 (1): 15-32.
 6. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease, Microbiology and Molecular Biology Reviews.*
 7. Panuju, Sherly. 2003. *Isolasi dan Pemilihan Mikroba Termofilik Penghasil Enzim Hidrolase. Skripsi yang tidak dipublikasikan.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.
 8. Madhavi, Jatavathu, Srilakshmi, Jatavathu, Rao, K. R. S., Sambasiva, dan Rao, M. V., Raghavendra. 2011. Efficient Leather Dehairing by Bacterial Thermostable Protease. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology* 3 (4): 11-26.
 9. Zilda, D.W., Irianto, H. E., Patantis, Gintung, Fawzya, Y. N., Harmayani, Eni, Widada, Jaka, dan Asmara, Widya. 2012. Screening of Thermostable Protease Producing Microorganisms Isolated from Indonesian Hotspring. *Squalen* 7 (3): 105-114.
 10. Agustini, Rudiana. 2006. Pemanfaatan Protease Termofil yang Hidup di Sumber Air Panas Cangar Batu Malang. *Indo. J. Chem* 6 (2): 205-211
 11. Wahyuna, Dina, dan Agustien, Anthoni. 2012. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Termo-Proteolitik Sumber Air Panas Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi. *J. Bio. UA* 1 (2): 93-98.
 12. 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): 113-121.
 13. Sugiyono, Lintang, Rosita, A.J., dan Sabe, R. A. 2003. Penapisan dan Karakteristik Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso sulawesi Tengah. (3): 49-55.
 14. Pakpahan, R. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktifitas protease Termofilik Dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Tesis yang tidak dipublikasikan.* Medan: Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
 15. Muharni, Juswardi, dan Prihandayani, Istantina. 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Protease dari Sumber Air Panas Tanjung Sakti Lahat Sumatera Selatan. *J. Bio. Universitas Sriwijaya:* 139-143.
 16. Baehaki, Ace. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya Sumatera Selatan. *J. Teknol dan Industri Pangan* 22 (1): 37-42.
 17. Pelczar, M. J. dan Chan, ECS. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi.* Penerjemah Hadioetomo, R. S. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
 18. Badriyah, Baital I., dan Ardyati, Tri. 2013. Deteksi Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri asal Ampas Tahu pada Substrat Bekatul. *Jurnal Biotropika* 1 (3): 109-113.
 19. Brock, T. D. 1986. *Introduction: An overview of the Thermophiles, in: Thermophiles: General, Molecular and applied Microbiology* Ed. T. D. Brock, A wiley inter science publication, John Willey and Sons, New York.
 20. Noviyanti, Tri, Ardiningsih, Puji, dan Rahmalia, Winda. 2012. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora Diels*). *JKK*, 1 (1): 31-34.