

SEMI PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE *Bacillus* sp.

Elidar Naiola dan Nunuk Widhyastuti

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi – LIPI
Jln Ir. H Juanda 18, PO Box 208, Bogor

ABSTRACT

The aim of the research was to find the partial purified of enzyme protease from *Bacillus* sp. The crude enzyme of protease was produce in rice brand medium (100 gram of rice brand in a liter tofu liquid waste). The enzyme was semi-purified by the procedure of precipitation using ethanol in different percentages of saturation, gel filtration using Sephadex G 100 and Ion Exchanged Chromatography using DEAE Sephadex A50. Specific activities of the enzyme during purification were 5.71 U/mg (crude enzyme); 6.75 U/mg (ethanol precipitations); 37.16 U/mg (gel filtration) and 43.02 U/mg (Ion Exchanged Chromatography). The optimum temperature for enzyme reaction was 45–50 °C, while the optimum pH was 7.0–8.0. Protease was relatively stable after heating until 37–50 °C for 60 minutes. Metal ions had different effects to the enzyme. CaCl_2 , FeCl_3 , MnCl_2 , ZnCl_2 and MgCl_2 increased enzyme activity, CdCl_2 and HgCl_2 gave an inhibitory effect, and another of metal ions had no effects to the enzyme.

Key words: purification, protease, characterization, gel filtration

PENGANTAR

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida kecil dan asam amino. Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim protease dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase terdiri atas karboksi-ekso-peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino-ekso-peptidase dari gugus amino terminal, sedang endopeptidase memecah ikatan peptida dari dalam (Bergmann, 1942; Mubarik *et al.*, 2000).

Penggunaan enzim protease dalam berbagai produk komersial semakin meluasnya sejalan dengan kemajuan dalam bidang bioteknologi. Protease dimanfaatkan dalam bidang industri antara lain dalam pengolahan pangan, penyamakan kulit, deterjen, dan pengolahan limbah cair. Di Indonesia kebutuhan akan enzim protease juga semakin meningkat namun kebutuhan ini hanya masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut perlu ada usaha untuk memproduksi enzim protease (Daniel, 1979; Suhartono, 1989; Thomas, 1984).

Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim mempunyai beberapa kelebihan, di antaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah. Mikroorganisme penghasil protease dapat berupa bakteri, kapang, maupun khamir. Enzim protease dari bakteri mulai diperkenalkan tahun

1960-an oleh Gebruder Schyder dari Swiss dan Novo Industri A/S dari Denmark, dan sampai sekarang penggunaan bakteri sebagai penghasil protease mempunyai peluang yang besar (Basuki, 1997). Beberapa jenis *Bacillus* dilaporkan mampu menghasilkan protease di antaranya *B. thermoglucosidasius AF-01* (Fuad *dkk.*, 2004).

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat diisolasi dengan cara memisahkan sel secara sentrifugasi dan selanjutnya pemurnian dilakukan dengan cara pengendapan, gel filtrasi, dan kromatografi penukar ion (Smith, 1990). Cara sederhana yang paling umum dilakukan adalah metode pengendapan pada suhu dingin dengan konsentrasi garam amonium yang tinggi tertentu (berbeda-beda) atau pakai pelarut organik, endapan dilarutkan dalam buffer dan pemurnian dilanjutnya dengan dialisis (Deutcher, 1990), tingkat kemurnian enzim serta aktivitas spesifiknya ditentukan (Trevor, 1991).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari beberapa karakteristik protease kasar dan enzim semimurni protease *Bacillus* sp, karena enzim protease banyak diaplikasikan dalam bentuk ekstrak kasar (*crude*) atau semimurni.

BAHAN DAN CARA KERJA

Mikroorganisme

Bacillus sp yang digunakan merupakan koleksi Bidang Mikrobiologi Puslit Biologi, LIPI, Bogor. Isolat diisolasi dari susu skim bubuk dan mempunyai kemampuan proteolitik (Naiola dan Widhyastuti, 2002).

Media

Media untuk memelihara isolat bakteri yang digunakan adalah nutrient agar dengan komposisi; *beef extract* 3 g, pepton 5 g, bacto agar 20 g dalam satu liter akuades.

Sebagai media produksi protease digunakan media dedak dengan komposisi 50 g dedak dalam satu liter limbah cair tahu.

Starter dipersiapkan dengan cara menumbuhkan satu ose biakan dalam medium mengandung 20% susu kedelai dan 5% laktosa, di atas alat pengocok dengan kecepatan 100 rpm, suhu kamar selama satu hari. Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam 20 ml media produksi yang dipersiapkan dalam Erlenmeyer 100 ml, selanjutnya diinkubasikan selama 3 hari di atas alat pengocok dengan kecepatan 130 rpm. Untuk memisahkan larutan enzim dari partikel-partikel substrat, kultur disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Filtrat atau enzim kasar yang diperoleh diukur aktivitas proteasenya.

Pengukuran aktivitas protease

Pengukuran aktivitas protease dilakukan menurut cara yang dilakukan Enggel *et al.* (2004). Sebanyak 0,5 ml larutan enzim ditambahkan dengan 0,5 ml larutan 0,05 M buffer fosfat pH 7 dan preinkubasikan pada suhu 37 °C selama 5 menit, selanjutnya tambahkan 0,5 ml substrat (2% kasein dalam 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7), campuran diinkubasikan pada suhu 37° C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml 0,4 M asam trikloroasetat (TCA). Selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no. 1. Sebanyak 0,5 ml filtrat ditambah dengan 2,5 ml 0,5 M natrium karbonat, preinkubasikan selama 10 menit, dan kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen *Folin Ciocalteau* dan inkubasikan ulang selama 30 menit. Melakukan pembacaan *optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Untuk setiap kali pengujian kurang dengan blanko (sebagai blanko digunakan larutan enzim dengan perlakuan yang sama), kecuali penambahan TCA dilakukan sebelum penambahan substrat. Satu unit aktivitas enzim protease dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 mikrogram tirosin setiap mililiter setiap menit dalam kondisi pengukuran.

Uji aktivitas enzim dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas protease pada ekstrak kasar. Penentuan kondisi optimum protease dilakukan karena aktivitas suatu enzim sangat tergantung pada kondisi, di antaranya pH, suhu dan waktu inkubasi.

Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas dan Stabilitas Protease

Suhu optimal yang dibutuhkan untuk reaksi enzimatik dicari dengan cara mengukur aktivitas enzim protease pada suhu yang bervariasi (37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, dan 70) pada 3 macam pH yaitu pH 7,0; 8,0; dan 9,0. Cara pengukuran aktivitas enzim sama seperti standar pengukuran sebelumnya. Larutan buffer yang digunakan disesuaikan dengan pH yang diinginkan, untuk pH 7,0 digunakan larutan 0,05 M buffer fosfat, pH 8,0 (larutan buffer 0,05 M Tris-HCl), dan pH 9,0 (larutan buffer 0,05 M Atkin-Pantin).

Stabilitas enzim protease terhadap suhu diukur dengan cara menginkubasikan larutan enzim selama 1 jam pada suhu yang bervariasi (37, 40, 45, 50, dan 55), segera setelah inkubasi larutan enzim didinginkan dengan cepat dan aktivitas enzim protease yang tersisa diukur dengan cara yang sama dan nilainya dinyatakan dalam persen terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan.

Pengaruh Berbagai Kation terhadap Aktivitas Protease

Pengaruh berbagai kation terhadap protease *Bacillus sp.* ditentukan dengan cara enzim diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 37 °C dalam 0,1 M larutan buffer fosfat pH 7,0 yang mengandung 0,5 mM berbagai kation yang berasal dari CdCl₂, HgCl₂, SrCl₂, CuCl₂, AgCl₂, CoCl₂, SnCl₂, BaCl₂, CaCl₂, FeCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, dan MgCl₂. Aktivitas enzim protease tersisa diukur pada kondisi standar yang nilainya dinyatakan dalam persen terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan.

Semi purifikasi Enzim Protease

Tahapan-tahapan pemurnian yang dilakukan adalah pengendapan dengan amonium sulfat dan alkohol, pemurnian enzim dengan filtrasi gel, dan kolom kromatografi penukar ion.

Tahap awal dilakukan pengendapan dengan menggunakan amonium sulfat dan alkohol. Untuk mendapatkan konsentrasi amonium sulfat dan alkohol yang tepat untuk digunakan dalam pengendapan enzim, maka beberapa tingkat konsentrasi dicoba (konsentrasi 20% sampai dengan konsentrasi 80%). Amonium sulfat dan alkohol ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam larutan enzim sambil diaduk sampai mencapai konsentrasi yang diinginkan. Suhu dijaga tetap dingin (untuk mencegah kerusakan enzim) dengan menggunakan es yang diletakkan

di sekelilingnya. Setelah semua garam amonium sulfat melarut atau alkohol tercampur homogen, larutan enzim didiamkan satu malam dalam lemari pendingin.

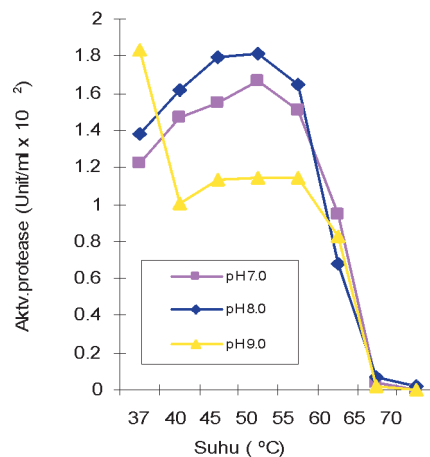
Endapan enzim dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada suhu 4 °C kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Endapan yang terbentuk setelah sentrifugasi, dilarutkan dalam sedikit 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7,0. Larutan buffer dengan pH 7,0 digunakan karena pada pH tersebut enzim kelihatan lebih stabil dibandingkan pH lainnya. Larutan enzim dari hasil pengendapan didialisis dan selanjutnya dilewatkan melalui kolom yang berisi matriks Sephadex G 100 yang sebelumnya telah diekuilibrasikan dengan menggunakan 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7,0. Enzim dibilas dengan menggunakan larutan buffer yang sama pada kecepatan aliran 30 ml/jam. Setiap 3 ml hasil elusi ditampung ke dalam fraksi-fraksi, diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm, ukur aktivitas enzimnya dan kemudian dibuat grafik pola elusinya. Fraksi-fraksi yang mengandung enzim protease digabungkan dan dipisahkan dengan cara kering beku.

Tahap selanjutnya adalah pemurnian enzim dengan kolom kromatografi penukar ion. Larutan enzim dilewatkan pada kolom kromatografi penukar ion yang berisi matriks DEAE Sephadex A 50 yang sebelumnya telah diekuilibrasikan dengan menggunakan 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7,0. Kolom kromatografi kemudian dibilas dengan menggunakan larutan buffer yang sama untuk mengeluarkan protein atau senyawa-senyawa yang tidak terikat pada matriks. Protein yang diperkirakan terikat pada matriks dibilas dengan menggunakan gradien linier larutan NaCl (0–0,05 M) dalam 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7,0 pada kecepatan aliran 30 ml/jam dan setiap 3 ml hasil elusi ditampung, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm dan diukur aktivitas proteasenya. Fraksi-fraksi yang mengandung protease digabungkan dan dikering beku. Protein enzim ditentukan menurut cara Bradford (1976).

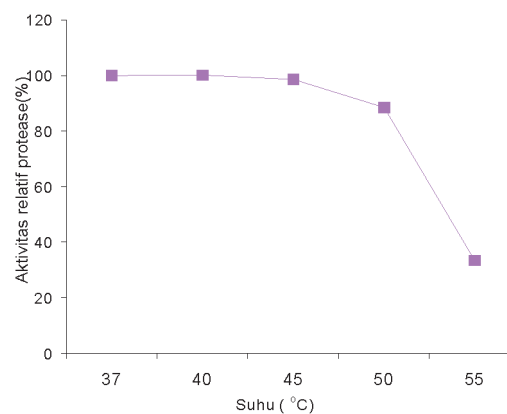
HASIL

Aktivitas protease *Bacillus* sp pada medium produksi dedak dalam limbah tahu dengan skala kecil (20 ml) menurut Elidar dkk, 2002 adalah 1,14 U/ml. $\times 10^{-2}$ U/ml. Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi protease *Bacillus* sp. menunjukkan bahwa aktivitas protease meningkat sejalan dengan bertambahnya waktu inkubasi sampai pada hari ke-4, aktivitas tersebut kelihatan stabil sampai hari ke-6.

Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor di antaranya kondisi pH, suhu, dan waktu inkubasi.



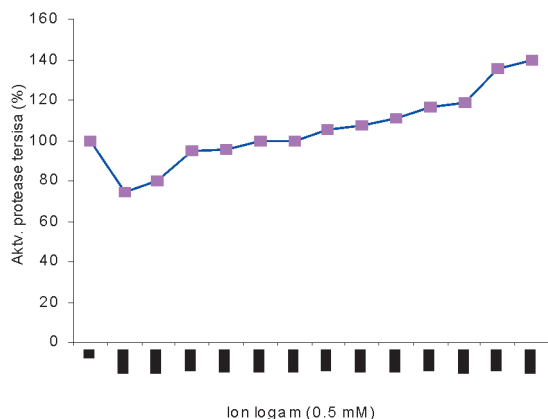
Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease kasar *Bacillus* sp. pada berbagai pH



Gambar 2. Stabilitas protease kasar *Bacillus* sp. terhadap suhu (°C)

Beberapa karakteristik protease kasar yang dihasilkan *Bacillus* sp. dipelajari karena enzim protease banyak diaplikasikan dalam bentuk ekstrak kasar (*crude*). Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease pada berbagai pH ditampilkan pada Gambar 1.

Data pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pada kondisi pH 7,0; 8,0; dan 9,0 suhu optimum enzim protease *Bacillus* sp berada pada kisaran 40–55 °C, sedangkan pada suhu > 55 °C aktivitas protease menurun bahkan kehilangan aktivitasnya apabila suhu mencapai 70 °C. Aktivitas protease pada pH 9,0 lebih rendah apabila dibandingkan dengan aktivitasnya pada pH 7,0 dan 8,0. Aktivitas protease *Bacillus* sp pada pH 8,0 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan pada pH 7,0 namun berdasarkan percobaan sebelumnya protease lebih stabil pada pH 7,0. Hasil uji stabilitas protease menunjukkan



Gambar 3. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease *Bacillus sp*.

bahwa pada pH 7,0 protease *Bacillus sp* stabil pada kisaran suhu 37–45 °C (Gambar 2).

Pengaruh penambahan berbagai jenis ion logam terhadap aktivitas protease kasar *Bacillus sp*. ditunjukkan pada Gambar 3.

Dua dari beberapa ion logam yang diujikan dapat menghambat reaksi enzimatik, kedua jenis logam yang dapat menghambat aktivitas enzim protease tersebut adalah ion logam (Cd^{2+} dan Hg^{2+}) sebaliknya Mg^{2+} dan Zn^{2+} dapat meningkatkan aktivitas enzim protease sampai 140%. Menurut Suhartono dkk. (2000) ada beberapa protease yang membutuhkan ion logam tertentu untuk meningkatkan aktivitasnya di antaranya penambahan ion logam Ca^{2+} terhadap *Bacillus pumilus* Y1.

Protease kasar *Bacillus sp*. yang diproduksi pada media dedak (50 g dedak dalam satu liter limbah cair tahu) menghasilkan protease dengan aktivitas spesifik 5,73. Hasil pengendapan dengan $(NH_4)_2SO_4$ tidak memberikan hasil yang baik. Pengendapan protease dengan menggunakan alkohol menunjukkan bahwa dengan penambahan etanol sebesar 40% protein enzim mulai mengendap dan pada konsentrasi 70% sudah mengendap seluruhnya (Tabel 1).

Pemisahan antara endapan dan supernatan dilakukan secara sentrifugasi kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.

Tabel 1. Pengendapan enzim protease *Bacillus sp* dengan alkohol

| No. | Konsentrasi alkohol (%) | Aktivitas protease ($\times 10^2$) U/ml dalam larutan bebas enzim |
|-----|-------------------------|---|
| 1 | 0 | 11,48 |
| 2 | 30 | 12,47 |
| 3 | 40 | 12,36 |
| 4 | 50 | 9,52 |
| 5 | 60 | 4,82 |
| 6 | 70 | 0,57 |
| 7 | 80 | 0 |

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa endapan enzim terbanyak terjadi pada konsentrasi 70%. Aktivitas spesifik protease setelah pengendapan adalah 6,75 U/mg.

Enzim hasil pengendapan didialisis dan berikutnya dimurnikan dengan cara permeasi gel melalui kolom berisi matriks Sephadex G 100 dan dibilas dengan larutan 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7,0. Hasil elusi memperlihatkan tiga puncak utama protein. Hasil pengujian aktivitas protease terhadap fraksi-fraksi yang ditampung, diketahui ada dua macam protease dengan berat molekul berbeda. Aktivitas protease setelah permeasi gel sebesar 37,16 U/mg.

Pemurnian protease dengan menggunakan kromatografi penukar ion yaitu dengan cara melewatkannya pada kolom berisi matrik DEAE Sephadex A 50 dan protein yang terikat dibilas dengan gradien linier 0,5 M NaCl diperoleh protease dengan aktivitas spesifik 43,02 U/mg.

Pengamatan pada setiap perlakuan dan tahap pemurnian enzim meliputi pengujian aktivitas terhadap protein hasil pengendapan etanol, hasil filtrasi gel melalui Sephadex G100 serta hasil kromatografi penukar ion Sephadex A 50 ditampilkan pada Tabel 2, namun pengamatan dengan menggunakan SDS–PAGE tidak dilakukan.

PEMBAHASAN

Reaksi enzimatik dari enzim protease *Bacillus sp*. dipengaruhi oleh adanya ion logam. Dua dari beberapa ion logam yang diujikan dapat menghambat reaksi enzimatik,

Tabel 2. Aktivitas spesifik protease pada tahap-tahap pemurnian

| | Vol/ml | Total aktivitas. | Total protein (mg) | Aktiv. spesifik (U/mg) | Rendemen (%) | Tingkat kemurnian |
|-----------------------|--------|------------------|--------------------|------------------------|--------------|-------------------|
| Enzim kasar | 400 | 45,92 | 8,04 | 5,73 | 100 | 1,0 |
| Pengendapan (alkohol) | 3 | 44,27 | 6,52 | 6,75 | 0,75 | 1,2 |
| Sephadex G100 | 57 | 747,61 | 20,12 | 37,16 | 14,25 | 6,5 |
| DEAE Sephadex A 50 | 51 | 296,21 | 6,86 | 43,02 | 12,75 | 7,5 |

kedua jenis logam yang dapat menghambat aktivitas enzim protease tersebut adalah ion logam Cd^{2+} dan Hg^{2+} .

Pemurnian enzim protease yang dilakukan secara pengendapan dengan menggunakan amonium sulfat dan alkohol, kedua cara tersebut merupakan cara pemurnian yang paling sederhana dan harganya relatif sangat murah dibandingkan dengan cara pemurnian lainnya, meskipun tingkat kemurnian enzim yang diperoleh sangat rendah. Protein enzim yang dihasilkan tidak terdenaturasi. Pengendapan protease dengan amonium sulfat hasilnya tidak memuaskan, meskipun pada konsentrasi amonium sulfat 65% seluruh protein enzim sudah mengendap dengan aktivitas spesifik enzim 5,085 U/mg. Larutan enzim protease hasil pengendapan didialisis dengan menggunakan membran dialisis yang memiliki *molecular weight cutoff* 14.000. Dengan cara ini diharapkan protein enzim yang merupakan makromolekul akan tetap tertahan di dalam membran sedangkan senyawa-senyawa lain yang memiliki berat molekul kurang dari 14.000 akan keluar melalui membran semipermeabel, namun demikian sisa garam ammonium masih terdapat dan memengaruhi proses pemurnian dan setelah dilewatkan melalui kolom permeasi gel berisi matrik Sephadex G 100 g tidak memberikan polla elusi yang baik.

Pengendapan protease dengan menggunakan alkohol dingin jenuh menunjukkan bahwa seluruh protein enzim mengendap pada konsentarsi 70%. Dan aktivitas spesifik protease setelah pengendapan adalah 6,75 U/mg.

Dialisis yaitu cara pemisahan makromolekul dari mikromolekul dengan cara melewati larutan melalui suatu membran semipermeabel, yang sebelumnya dididihkan dengan EDTA alkali selama 30 menit untuk menghilangkan ion-ion logam. Selama dialisis air masuk ke dalam kantung dialisis karena adanya perbedaan tekanan osmosis. Kecepatan dialisis tergantung pada suhu dan tekanan. Dialisis dilakukan pada kondisi dingin untuk mencegah terjadinya kerusakan protein enzim yang dimurnikan. Molekul-molekul yang memiliki bobot molekul rendah dapat keluar dari kantung dialisis.

Filtrasi gel adalah suatu teknik memisahkan zat-zat berdasarkan ukuran molekulnya. Pemisahan terjadi antara fase cair di dalam partikel dan cairan yang mengelilingi partikel gel. Akibat dari perbedaan laju permeasi masing-masing molekul zat terlarut maka terjadi pemisahan. Dengan cara permeasi gel (melalui kolom berisi matriks Sephadex G 100) yang dibilas dengan larutan 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7,0 protein yang memiliki berat molekul lebih rendah akan terbilas lebih dahulu. Hasil elusi memperlihatkan adanya tiga puncak utama protein. Berdasarkan pengujian

aktivitas protease terhadap fraksi-fraksi yang ditampung (yang terdiri atas 3 puncak), diketahui ada dua macam protease dengan berat molekul berbeda dihasilkan, ditandai dengan adanya satu puncak yang mengandung aktivitas protease. Aktivitas protease setelah permeasi gel sebesar 37,16 U/mg.

Fraksi yang mengandung enzim protease digabungkan, dikecilkan volumenya secara kering beku dan selanjutnya dilarutkan dalam sedikit larutan buffer fosfat. Setelah dilewatkan melalui kolom berisi matrik DEAE Sephadex A 50 dan protein yang terikat dibilas dengan gradien linier NaCl (0,5 M), sehingga protein yang memiliki muatan berbeda akan terbawa oleh larutan buffer yang mengandung NaCl pada konsentrasi yang berbeda. Penentuan aktivitas spesifik setiap fraksi penting untuk menentukan tingkat kemurnian (Trevor, 1991) dan aktivitas spesifik protease setelah pemurnian dengan kromatografi penukar ion adalah 43,02 U/mg.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa enzim kasar protease *Bacillus* sp dengan media dedak (50 g dedak dalam satu liter limbah cair tahu) menghasilkan enzim protease dengan aktivitas spesifik selama proses pemurnian sebesar 5,71 U/mg (enzim kasar); 6,75 U/mg (pengendapan dengan alkohol); 37,16 U/mg (gel filtrasi Sephadex G100) and 43,02 U/mg (kromatografi penukar ion DEAE Sephadex A 50).

Suhu optimal untuk reaksi enzimatik adalah 45–50 °C, dan pH 7,0–8,0. Ion logam memberikan efek yang berbeda terhadap enzim dua dari beberapa yang diujikan (Cd^{2+} dan Hg^{2+}) dapat menghambat reaksi enzimatik.

KEPUSTAKAAN

- Basuki W, 1997. Enzim dalam industri deterjen. Proceeding the first Conference on Industrial Enzyme and Biotechnology; Technology, Strategy and Finance, September 10–11, Jakarta.
- Bergmann M, 1942. A classification of proteolytic enzymes. *Adv. Enzymol.*
- Bradford MM, 1976. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. *Anal. Biochem.* 72: 248–254
- Daniel ICW, 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Willey and Sons, New York.
- Deutscher PM, 1990. "Methods in Enzymology", 182. Academic Press Inc., New York, 285–289.
- Elidar dkk., 2000.
- Enggel J, Meriandini A dan Natalia L, 2004. Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 9(1): 9–12.

- Fuad AM, Rahmawati R dan Mubarik NR, 2004. Produksi dan karakterisasi Parsial Protease Alkali Termotabil *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 9(1): 29–35.
- Mubarik NR, Suwanto A dan Suhartono MT, 2000. Isolasi dan karakterisasi protease ekstraseluler dari isolat bakteri termofilik ekstrim. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II. Mikrobiologi, Enzim dan Bioteknologi Dalam Perspektif Ekonomi dan Industri*. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta, 151–158.
- Naiola E dan Widhyastuti N, 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari beberapa isolat bakteri. *Berita Biologi*. 16(3): 467–473.
- Smith EJ, 1990. “*Biotechnology Principle*”, Terjemahan Usman FS, Bambang S dan Agung S, PT Gramedia, Jakarta, 132–135; 182–183.
- Suhartono MT, 2000. Eksplorasi protease bakteri asal Indonesia untuk aplikasi industri dan riset bioteknologi. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*. 125–133.
- Thomas DB, 1984. *A Textbook of Industrial Microbiology*. Sinaver Associates Sunderland, USA.
- Trevor P, 1991. *Understanding Enzyme*, 3rd ed., Elis Harwood, New York, 306–307.

Reviewer: **Dr. Ni Nyoman Tri P., MSi.**