

ISOLASI, SELEKSI DAN OPTIMASI PRODUKSI PROTEASE DARIBEBERAPA ISOLAT BAKTERI

(Isolation, Selection and Optimization of Protease Production of Some Bacterial Isolates)

Elidar Naiola^{D3} dan Nunuk Widhyastuti

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi - LIPI, Bogor

ABSTRACT

Thirty-seven out of sixty-one bacterial isolates from various sources of samples were screened for protease production. The isolate of ISO PL3 could produce the highest enzyme activity, and it was used as a standard bacterial strain in this observation. For any reason, we implemented ISO PL2 to study the optimum condition for producing bacterial protease. Result shows that the maximum protease activity was obtained in a medium containing 100 gram of rice brand in a liter tofu liquid waste. The optimum for incubation was 4 - 6 days (agitation of 130 rpm at room temperature) and pH 5.0 - 6.0. After cultivating on this liquid medium, the maximum protease activity of the ISO PL3 was $113,52 \times 10^2$ U/ml. From the studies on morphological and physiological characterization, it was indicated that ISO PL3 resemble with the species *Bacillus macerans*.

Kata kunci/ Key words: Produksi protease/Protease production. *Bacillus macerans*, isolasi/isolation, seleksi/selection, skrining/screened, karakterisasi/characterization

PENDAHULUAN

Protease ekstraselular adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino. Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim protease dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase terdiri dari karboksik-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).

Kebutuhan enzim protease dewasa ini semakin meningkat terutama dalam bidang pangan seperti industri keju, bir dan roti, sedangkan bidang non pangan seperti dalam pembuatan deterjen dan penyamakan kulit. Kemajuan dalam bidang bioteknologi memungkinkan semakin meluasnya penggunaan enzim protease dalam berbagai produk komersial. Di Indonesia kebutuhan akan enzim protease juga semakin meningkat namun kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap produksi impor tersebut perlu adanya usaha untuk memproduksi enzim protease (Daniel, 1979; Suhartono, 1989; Thomas, 1984).

Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme. Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim, khususnya protease mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah (Thomas, 1984). Mikroorganisme penghasil protease dapat berupa bakteri, kapang maupun khamir. Enzim protease dari bakteri mulai diperkenalkan sekitar 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 untuk memproduksi protease (Basuki, 1997).

Media produksi untuk menghasilkan enzim harus memenuhi kebutuhan dasar untuk menghasilkan sel serta produk. Unsur utama yang paling dibutuhkan adalah nitrogen dan karbon. Nitrogen sangat diperlukan untuk pertumbuhan sel, sedang unsur karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis (Aunstrup, 1979).

Berdasarkan alasan tersebut di atas, penelitian ini dilakukan untuk mencari biakan bakteri, serta media yang cocok untuk produksi enzim protease.

BAHAN DAN METODA

Bakteri

Isolat-isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian diisolasi dari beberapa contoh makanan fermentasi (tape, tempe, oncom, kecap, ragi tape) serta dari beberapa contoh tanah dan air sungai. Contoh-contoh tersebut diambil dari daerah sekitar Jabotabek, Bandung, Semarang, Yogyakarta dan Surabaya. Isolat-isolat terseleksi dipelihara dalam medium miring Nutrient Agar.

Isolasi bakteri

Media yang digunakan untuk isolasi adalah media susu skim yang mengandung susu skim 20 g, pepton 5 g, agar 15 g dalam satu liter (Cappuccino, 1983). Sampel diinokulasikan ke dalam media cair atau langsung pada permukaan media agar. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar di atas alat pengocok pada kecepatan 100 rpm. Setelah inkubasi selama 24 jam, 1 setetes larutan yang sudah ditumbuhi bakteri diambil dan diinokulasikan pada permukaan media padat dengan komposisi yang sama. Isolat yang tumbuh dipelihara pada agar miring NA untuk diuji lebih lanjut.

Seleksi isolat penghasil protease secara kualitatif

Secara kualitatif pengujian dilakukan dengan menumbuhkan satu "loopful" bakteri terseleksi pada permukaan medium yang sama, setelah ditumbuhkan selama 2-3 hari pada suhu kamar, aktivitas protease ditunjukkan dengan adanya zona lingkaran jernih disekitar koloni. Hasil bagi diameter lingkaran jernih dengan diameter koloni dinyatakan sebagai aktivitas protease secara relatif.

Isolat-isolat yang memperlihatkan adanya aktivitas protease dengan nilai nisbi > 2 , selanjutnya diuji secara kuantitatif.

Pengujian aktivitas protease secara kuantitatif

Sebagai *starter* digunakan biakan bakteri yang sudah ditumbuhkan pada medium mengandung 20% susu kedelai dan 5% laktosa, digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 100 rpm, pada suhu kamar selama satu hari. Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam 20 ml medium yang sama, inkubasikan selama 3 hari di atas alat pengocok dengan kecepatan 130 rpm. Selanjutnya kultur disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan

larutan enzim dari partikel-partikel substrat. Filtrat yang diperoleh diukur aktifitas proteasenya.

Aktivitas protease diukur dengan menggunakan kasein Hammersten sebagai substrat (2% casein dalam 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7,0). Sebanyak 0,5 ml larutan enzim ditambahkan pada 0,5 ml larutan 0,05 M buffer fosfat pH 7 dan diinkubasikan terlebih dahulu pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml substrat. Campuran reaksi diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml 0,4 M Trichloroacetic acid (TCA). Selanjutnya supernatan dipisahkan dari endapan dengan menggunakan kertas saring Whatman no. 1. Sebanyak 0,5 ml filtrat ditambah dengan 2,5 ml 0,5 M Natrium karbonat, dipreinkubasikan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen Folin Ciocalteu dan diinkubasikan kembali selama 30 menit. Pembacaan Optical density (OD) dilakukan pada panjang gelombang 660 nm. Untuk setiap kali pengujian dikurangi dengan blanko. Sebagai blanko digunakan larutan enzim dengan perlakuan yang sama, tetapi penambahan TCA dilakukan sebelum penambahan substrat. Satu unit aktivitas enzim protease adalah banyaknya enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 mikrogram tirosin.

Optimasi media produksi protease

Media yang sesuai untuk produksi protease didapat dengan cara menumbuhkan isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease cukup tinggi dalam media yang mengandung berbagai macam substrat. Substrat yang digunakan merupakan bahan-bahan yang mudah didapat, banyak tersedia dengan harga yang relatif sangat murah. Media yang digunakan adalah sebagai berikut: Media (A) terdiri dari 50 g ampas tahu, 5 g onggok, 100 ml limbah cair tahu, dalam satu liter akuades; Media (B) terdiri dari 100 g dedak dalam satu liter akuades, Media (C) terdiri dari 50 g dedak dalam satu liter limbah cair tahu, Media (D) terdiri dari 200 ml susu kedelai dalam satu liter akuades; Media (E) terdiri dari susu kedelai 200 ml, laktosa 50 g dalam satu liter akuades, dan Media (F) terdiri dari limbah cair tahu.

Untuk mengetahui pH media yang optimal untuk memproduksi protease, maka isolat terseleksi

ditumbuhkan dalam media dengan kondisi pH awal 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 dan 10,0.

Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi protease dipelajari dengan menumbuhkan isolat terseleksi dalam media yang sudah terseleksi (50 gr dedak/ liter limbah tahu). Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan isolat tersebut dalam 1,5 liter media yang disiapkan dalam fermentor berkapasitas 3 liter. Pengujian aktivitas protease dilakukan setiap hari dengan melakukan sampling setiap hari sampai hari ke 10.

HASIL

Enampuluh satu dari 64 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari berbagai contoh, dapat tumbuh dengan baik dalam media susu skim. Hasil pengujian aktivitas protease secara kualitatif dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji kualitatif aktivitas protease isolat-isolat bakteri

No	Kode biak	Pertumbuhan	Aktivitas protease (kualitatif)
(1)	(2)	(3)	(4)
1	16.2.2a	+	++
2	21.1.1	++++	++
3	23.1.1	+	-
4	24.3.2a	+++	-
5	24.3.3a	++++	+
6	24.4.1	++++	+
7	24.4.1a	++++	+
8	27.1.2	++++	+
9	29.3.3	+++	++++
10	29.6.1a	+++	++++
11	29.7.1	+++	++++
12	29.8.2	+++	++++
13	32.1.2	++	++++
14	32.2.1	++	++++
15	37.1.2a	+++	++++
16	37.2.1a	++	++++
17	37.3.1a	-	-
18	39.2.3	+++	+
19	A.xy	-	-
20	Fi-6.2	++	+
21	A2	+	-
22	B1.1	+	-
23	B2	+	-
24	C2	+++	+
25	L3	+	-

Lanjutan Tabel 1. ...

(1)	(2)	(3)	(4)
26	M3	++	+++
27	M4	+	-
28	M6	++	++++
29	O2	+	-
30	O3	+	-
31	O4	+	-
32	O5	+	-
33	TE.1	+	-
34	TE.2	+	-
35	TE.3	+	-
36	Ti.5	+	-
37	Ti.6	+	++
38	Ti.7	+	-
39	On.2	+	-
40	On.3	+	-
41	Ri.s	++	+
42	Ri.pd	+	+
43	Tnh.1	++	+
44	Tnh.1.2	+	-
45	KL.1	+	-
46	KL.2	+	-
47	KL.3	+	-
48	KP.1	+	+++
49	KP.2	+	+++
50	KP.3	+	+++
51	KP.4	++	++
52	KPL.1	++	++
53	KPL.2	++	+++
54	KPL.3	++	+++
55	KPL.4	++	++
56	KPS.1	++	+
57	KPS.2	++	+
58	KPS.3	++	+
59	KPS.4	++++	+
60	Tnh.5	-	-
61	Tnh.6.1	+	+
62	Tnh.7	++	+++
63	KL.4	+	+
64	KL.5	+	-

Keterangan: ++++: Diameter zona bening sangat besar
 +++ : Diameter zona bening besar
 ++ : Diameter zona bening sedang
 + : Diameter zona bening kecil
 - : Tidak ada zona bening

Dari 64 isolat yang diuji ada 37 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas protease secara kualitatif yang ditandai dengan adanya lingkaran jernih disekitar koloni.

Kemudian setelah dilakukan pegujian secara semi-kuantitatif yaitu dengan menghitung aktivitas protease secara relatif (membandingkan diameter lingkaran jernih dan diameter koloni), hanya ada 17 isolat yang mempunyai aktivitas protease cukup tinggi.

Hasil uji aktivitas protease secara kuantitatif terhadap ke 17 isolat uji dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji kuantitatif aktivitas protease pada beberapa biakan bakteri

No	Isolat	Aktivitas protease (10 ² Vital)
1	29.6.1a	1,53
2	29.7.1	1,64
3	29.8.2	3,01
4	32.1.2	1,65
5	37.1.2a	1,76
6	P.I	0,10
7	P.2	1,36
8	P.3	0,00
9	PS.1	0,22
10	PL.2	16,40
11	PL.3	113,52
12	PL.4	27,26
13	Ti.6	0,00
14	Tnh.7	0,21
15	M3	4,57
16	M6	3,99
17	<i>u.substuis</i>	<i>5.H</i>

Hasil uji menunjukkan bahwa ada tiga isolat yang mempunyai aktivitas protease cukup tinggi, yaitu PL2, PL3 dan PL4 dengan aktivitas masing-masing sebesar 16,40 U/ml, 113,52 U/ml dan 27,26 U/ml. Dua isolat tidak memperlihatkan adanya aktivitas protease secara kuantitatif. Isolat-isolat lainnya mempunyai aktivitas protease yang berkisar antara 0,10-3,99 U/ml.

Optimasi kondisi media untuk fermentasi protease dipelajari dengan menumbuhkannya ISO PL2 pada berbagai macam substrat, fermentasi dilakukan diatas alat pengocok dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 3 hari hasilnya ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas protease ISO. PL.2 pada berbagai macam media

Media	Komposisi	Aktivitas protease (10 ² U/ml)
A	Amp as tahu 50 gr, onggok 5 gr, limbah cair tahu 100 ml, dalam satu liter akuades	5,99
B	100 gr dedak dalam satu liter akuades	13,26
C	50 gr dedak dalam satu liter limbah cair ahu	17,61
D	200 ml susu kedelai dalam satu liter akuades	2,87
E	200 ml susu kedelai, laktosa 50 gr dalam satu liter akuades	12,59
F	Limbah cair tahu	1,67

Hasilnya menunjukkan bahwa media B (mengandung dedak), media C (mengandung dedak dan limbah tahu) dan media E (mengandung susu kedelai dan laktosa) merupakan media yang baik digunakan untuk produksi protease. Aktivitas protease tertinggi sebesar 17,61 x 10⁻²U/ml dihasilkan dalam media C, sedang dalam media B dan E aktivitas protease masing-masing adalah 13,26 x 10²U/ml dan 12,59 x 10² U/ml. Dalam media A (mengandung ampas tahu, onggok dan limbah tahu), media D (mengandung susu kedelai) dan media F (mengandung limbah cair tahu) kelihatan kurang baik untuk digunakan sebagai media produksi protease (Tabel 4). Media media C yang mengandung dedak dan limbah tahu digunakan sebagai media produksi protease dari Isolat lainnya.

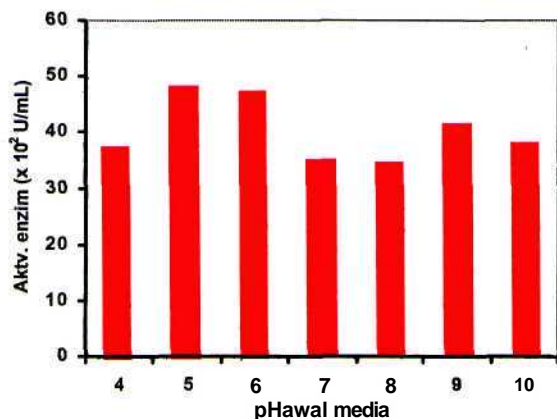
Isolat yang mempunyai aktivitas protease tertinggi yaitu ISO PL3 dilakukan identifikasi di Balai Penelitian Ternak, Bogor. Hasil identifikasi sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Identifikasi lengkap Isolat ISO PL3

Gram stain	Gram + (positif), batang, permukaan putih kasar, putih
Catalase	+
Oxidase	-
Motility	+
M ac conkey	-
Simmar citrat	-
Urease	-
Pepton	-
MRVP	-/-
Gelatin	-
Nitrate	+
Glucose (anaerobic)	+
Glukosa (aerob)	-
Arabinosa	+
Arabinosal	+
Manitol	+
Xylosa	+

Hasil uji diatas menunjukkan bahwa isolat PL3 menyerupai genus *Bacillus macerans*.

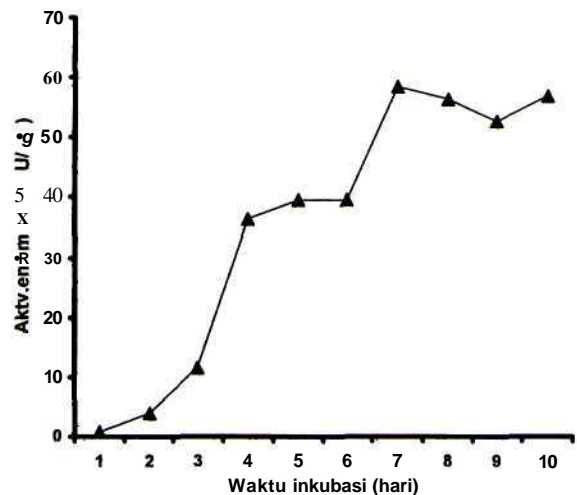
Pengaruh pH media terhadap produksi protease dipelajari dengan menumbuhkan ISO PL3 dalam media C (dedak + limbah cair tahu) pada kecepatan 130 rpm, suhu kamar dengan kondisi pH awal yang berkisar antara 4,0-10,0. Hasilnya ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh pH awal media terhadap protease

Data pada Gambar 1, menunjukkan bahwa enzim protease dapat diproduksi pada media dengan pH awal berkisar antara 4,0 - 10,0 atau kondisi asam sampai alkali, namun pada pH 5,0 - 6,0 aktivitasnya sedikit lebih tinggi dibandingkan pada pH lainnya.

Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi protease dari isolat ISO PL.3 diuji dengan menumbuhkan isolat tersebut dalam 1,5 liter media (dedak + limbah cair tahu) yang dipersiapkan dalam fermentor berkapasitas 3 liter. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 10 hari diatas alat pengocok berkecepatan kurang lebih 130 rpm (Gambar 2).



Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas protease

Data pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa aktivitas protease mulai meningkat setelah hari ke tiga dan pada hari ke 4-6 kelihatan stabil pada kisaran (36, 43 - 39,60) $\times 10^2$ U/ml dan pada hari ke 7-9 berkisar antara (52, 67 - 58, 54) $\times 10^2$ U/ml.

PEMBAHASAN

Hasil pengujian aktivitas protease yang diperoleh pada berbagai macam media produksi memperlihatkan bahwa aktivitas protease tertinggi dihasilkan apabila isolat terseleksi ditumbuhkan dalam media C (media yang mengandung 50 gr dedak/liter limbah cair tahu). Aktivitas protease yang dihasilkan dalam media tersebut adalah sebesar $17,61 \times 10^2$ U/mL. Dalam media yang hanya mengandung dedak (100 gr dedak/liter akuadest) aktivitas protease yang dihasilkan masih cukup tinggi yaitu $13,26 \times 10^2$ U/mL.

Tingginya aktivitas protease yang dihasilkan pada kedua media tersebut kemungkinan disebabkan bahwa dedak merupakan sumber protein, lemak, mineral dan vitamin yang sangat dibutuhkan oleh

bakteri untuk pertumbuhannya. Nilai rata-rata komposisi kimia bahan-bahan yang terkandung dalam beberapa macam dedak menurut Houston (1972), adalah air (8,4 - 14,7%), protein (9,8 - 15,4%), lemak (7,7 - 22,4%), bent (34,2 - 46,1%), seratkasar (5,7 - 20,9%) dan abu (7,1 - 20,6%); di samping itu juga mengandung unsur lainnya seperti pentosan dan selulosa. Komposisi kimia bahan tersebut bervariasi tergantung jenisnya. Limbah tahu cair menurut Raharjo (1955), terdiri dari air (74%), abu (0,12%), total protein (1,80%), lemak (1,2%), serat kasar (7,4%) dan abu (0,3%), di samping juga mengandung Cu, Mg, Ca, Na dan K.

Protease merupakan enzim yang produksinya dapat diinduksi oleh senyawa nitrogen sederhana. Disamping itu perbandingan antara unsur karbon dan nitrogen juga akan berpengaruh baik terhadap produksi enzim protease, maka penambahan limbah cair tahu kedalam dedak mungkin merupakan perbandingan yang cukup baik untuk menginduksi enzim protease, sehingga aktivitas protease dalam media tersebut lebih tinggi. Menurut Nurhayati (1997), produksi protease tertinggi dari *Bacillus subtilis* AICC 1633 diperoleh dengan penambahan 50% limbah cair tahu ke dalam media produksi.

Dalam media E yang mengandung 50 gr laktosa dan 200 ml susu kedelai/ liter akuades, aktivitas protease yang dihasilkan adalah $12,60 \times 10^2$ U/m. Aktivitas protease yang dihasilkan cukup tinggi karena laktosa merupakan sumber N yang baik untuk pertumbuhan bakteri, sedang susu kedelai juga kaya akan protein, karbohidrat serta unsur lainnya yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan dapat menginduksi terbentuknya enzim protease. Media mengandung laktosa dan susu kedelai dalam penelitian selanjutnya digunakan sebagai prakultur (media untuk starter) produksi protease.

Hasil pengamatan terhadap pH awal media menunjukkan bahwa pH awal media berpengaruh terhadap produksi protease. Pada media C (dedak + limbah cair tahu) dengan pH awal media 5,0-6,0 aktivitas protease lebih tinggi dibandingkan pH lainnya. Aktivitas protease pada pH 5,0 dan 6,0 masing-masing adalah $49,04 \times 10^{-2}$ U/mL dan $48,10 \times 10^2$ U/mL. Terlihat kecenderungan bahwa

media yang sesuai untuk produksi protease adalah media dengan kondisi sedikit asam sampai netral.

Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi protease dipelajari dengan menumbuhkan isolat terseleksi dalam 1,5 liter media mengandung dedak + limbah cair tahu yang dipersiapkan dalam fermentor berkapasitas 3 liter. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 10 hari diatas alat pengocok dengan kecepatan kurang lebih 130 rpm (Gambar 2). Setelah satu hari inkubasi produksi protease nampaknya masih rendah, yaitu $0,66 \times 10^{-2}$ U/m. Aktivitas tersebut meningkat sejalan dengan bertambahnya waktu inkubasi. Pada hari ke 4 sampai ke 6 aktivitas protease nampak cukup stabil yaitu berkisar antara $36,43 \times 10^2$ U/mL sampai $39,47 \times 10^2$ U/mL dan aktivitas tertinggi yaitu sebesar $58,54 \times 10^2$ U/mL dicapai pada hari ke 7, sedangkan pada hari-hari berikutnya aktivitas tersebut kelihatan mulai sedikit menurun. Untuk meningkatkan skala produksi dari skala kecil (20 ml) menjadi 1,5 liter nampaknya masih ada kendala, salah satu di antaranya adalah pengaturan kondisi fisik media produksi. Fermentor yang digunakan sangat sederhana, tanpa pengaturan aerasi. Agitasi yang digunakan diperkirakan sekitar 130 rpm. Diduga kondisi tersebut belum sesuai untuk mengatur laju pindah antar fase selama masa pertumbuhan dan untuk menjaga kondisi fisik serta kimia media agar tetap homogen.

KESIMPULAN

Hasil pengujian secara kualitatif dan kuantitatif menunjukkan bahwa 37 dari 61 isolat bakteri yang diisolasi dari beberapa macam contoh memiliki aktivitas protease. Aktivitas protease yang dihasilkan bervariasi sesuai dengan biaknya dan aktivitas protease tertinggi dihasilkan oleh ISO PL3 yaitu sebesar $113,520 \times 10^2$ U/ml. Hasil optimasi terhadap media produksi menunjukkan bahwa aktivitas protease tertinggi diperoleh dalam media dengan komposisi 50 g dedak/liter limbah cair tahu. Kondisi pH awal yang optimum untuk produksi protease berkisar antara pH 5,0-6,0. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat PL3 menyerupai *Bacillus macerans*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aunstrup K, 1979. Production Isolation and Economic of Extracellular Enzyme. *Appl. Biochem and Bioeng.* Vol. 2. Academic.
- Basuki W, 1997. Enzim dalam industri deterjen. *Proceedings of The 1st Conference on Industrial Enzyme and Biotechnology*, Jakarta, Him 206-213.
- Bergmann M, 1942.** A classification of proteolytic enzymes. *Adv. Enzymol.*
- Cappuccino JG, 1983.** *Microbiology: A laboratory Manual.* Addison-Wesley, USA.
- Daniel ICW, 1979.** *Fermentation and Enzyme Technology.* Jhon Wiley and Sons, New York.
- Houston DF, 1972.** Rice bran and polish. Dalam: *Rice Chemistry and Technology*, DF Houston (Ed). American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota.
- Mubarik NR, A. Suwanto **dan MT Suhartono, 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, Him 151-158.
- Nurhayati, Ninik and Sumaryanto, 1997.** Protease production by *Bacillus subtilis* ATCC 1633. *Proceeding The 1st Conferece on Industrial Enzyme and Biotechnology*, Him 201-205.
- Raharjo, 1995.** *Pemanfaatan Padatan Tersuspensi Dalam Limbah Tahu untuk Pakan Ternak.* Dinas Perindustrian, Ujung Pandang, Him 5-6.
- Suhartono MT, 2000.** Eksplorasi protease bakteri asal Indonesia untuk aplikasi industri dan riset bioteknologi. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II.* Him 125-133.
- Thomas DB, 1984.** *A Textbook of Industrial Microbiology.* Sinaver Associates, Sunderland, USA.