

Isolasi Bakteri Dari Tanah Gambut Penghasil Enzim Protease

Dede Mahdiyah

Akademi Kebidanan Sari Mulia Banjarmasin

Email: mahdiyahdede@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tanah gambut terbentuk dari hasil dekomposisi bahan-bahan organik dalam keadaan anaerob. Tanah gambut memiliki karakteristik fisika dan kimia yang dapat mempengaruhi tingkat kesuburan gambut. Mikroorganisme pada tanah gambut beranekaragam dan memiliki peranan penting sebagai dekomposer, penyedia unsur hara bagi tanaman, penghasil enzim. Peranan enzim sangat penting bagi industri makanan, obat, pertanian, dan peternakan. Salah satu enzim yang tersebar luas dan perannya cukup baik dalam industri adalah protease. Protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri dari tanah gambut penghasil protease. Metode penelitian yang dilakukan adalah pengambilan sampel tanah gambut, isolasi bakteri dari tanah gambut menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) dengan melalui teknik pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-7} pada media NaCl 0,9%, setelah itu uji protease menggunakan media NA dan susu skim 1%, untuk identifikasi bakteri menggunakan teknik pewarnaan Gram. Diperoleh hasil dari teknik isolasi bakteri dari tanah gambut sebanyak 180 isolat yang tumbuh baik dengan suhu inkubasi 37°C selama 24 jam. Isolat yang potensial sebagai penghasil protease sebanyak lima isolat yaitu isolat 3TG, 4TG, 5TG, 6TG, dan 7TG yang ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni selama 48 jam. Kelima isolat tersebut berdasarkan morfologi koloni yaitu memiliki bentuk bulat, bulat tidak beraturan, elevasi cembung, cekung dan datar, warna koloni putih, krem, kuning, kuning transparan dan orange. Berdasarkan uji pewarnaan Gram kelima isolat tersebut empat isolat merupakan bakteri Gram positif dan satu isolat yaitu 7TG termasuk Gram negatif.

Kata Kunci: Isolasi, Bakteri, Tanah Gambut.

ABSTRACT

Peat soil is formed from the decomposition of organic materials in anaerobic state. Peat soil has physical and chemical characteristics that can affect the level of fertility of peat. Microorganisms in diverse peat soil and has an important role as decomposers, provider of nutrients for plants, producing enzymes. The role of the enzyme is very important for the food industry, medicine, agriculture, and livestock. One enzyme is widespread and the have role quite well in the industry is a protease. Protease is catalisator

biologist to the reaction of protein breakdown. This enzyme catalyzes the hydrolysis reaction, the reaction involving water element on a substrate specific binding. This study aimed to isolated the bacteria from producing peat soil protease. Research methodology were peat soil sampling, isolation of bacteria from peat using media Nutrient Agar (NA) by the technique of dilution from 10⁻¹ to 10⁻⁷ in 0.9% NaCl media, after the test protease using NA and media skim milk 1%, for the identification of bacteria using Gram staining technique. The results obtained from the isolation of bacteria from the peat soil of 180 isolates that grow well with incubation temperature of 37°C for 24 hours. Isolates potential as a producer of protease five isolates that isolates 3TG, 4TG, 5TG, 6TG, and 7TG indicated by a clear zone around the colony for 48 hours. Fifth isolates were based on morphology of the colonies which have a spherical shape, irregular round, elevation convex, concave and flat, colony color white, beige, yellow, transparent yellow and orange. Gram staining test is based on the five isolates, four isolates are Gram-positive bacteria and one isolate that 7TG including Gram negative.

Keywords: *bacteria, isolate, peat soil.*

I. LATAR BELAKANG

Indonesia memiliki lahan gambut terluas di antara negara tropis, yaitu sekitar 21 juta ha, yang tersebar terutama di Sumatera, Kalimantan dan Papua (BB Litbang SDLP 2008). Setiap tahunnya luas gambut ini mengalami penurunan karena pembukaan lahan untuk kebutuhan manusia. Kondisi lahan gambut di Indonesia telah banyak yang rusak. Kerusakan tersebut umumnya karena kebakaran pada lahan gambut itu sendiri. Kebakaran lahan hutan gambut 99,9% disebabkan oleh manusia, baik disengaja maupun akibat kelalaiannya. Penyebab kebakaran karena manusia antara lain konversi lahan seperti pembukaan lahan untuk areal perkebunan, pertanian, dan pembangunan jembatan.

Gambut merupakan tanah yang terbentuk dari bahan organik pada fisiografi cekungan atau rawa, akumulasi

bahan organik pada kondisi jenuh air, kondisi anaerob yang menyebabkan proses perombakan bahan organik berjalan sangat lambat, sehingga terjadi akumulasi bahan organik yang membentuk tanah gambut (Muslihat 2003). Gambut memiliki sifat khas yang jarang diketahui oleh masyarakat awam, yaitu tidak dapat kembali ke bentuk semula dan seperti spons yang dapat menyerap air sebanyak mungkin namun jika sudah kering kemampuan itu akan hilang. Tanah gambut terbentuk dari akumulasi sisa-sisa tanaman purba yang mati dan sebagian mengalami perombakan, mengandung minimal 12-18% C-Organik dengan ketebalan minimal 50 cm, tanah gambut juga terbentuk dari hasil dekomposisi bahan-bahan organik dalam keadaan anaerob (Hakim *et al.*, 1986).

Tanah mengandung bermacam-macam mikroba meliputi berbagai spesies

bakteri, ganggang, cendawan dan lain-lain. Bakteri dan fungi sangat berperan aktif dalam memecah bahan-bahan organik sehingga banyak ditemukan di tanah gambut, karena tanah gambut terbentuk dari hasil dekomposisi bahan-bahan organik dalam keadaan anaerob. Aktivitas mikroba diperlukan untuk menjaga ketersediaan unsur hara penting bagi tanaman yaitu nitrogen. Nitrogen akan diubah kedalam bentuk amoniak menjadi nitrit dan nitrit menjadi nitrat oleh bakteri nitrifikasi (Darjamuni, 2003).

Tanah gambut juga bersifat masam, kemasaman gambut ini dipengaruhi oleh kandungan asam organik yang terdapat pada koloid gambut. Dekomposisi bahan organik pada kondisi anaerob menyebabkan terbentuknya senyawa fenolat dan karboksilat yang menyebabkan tingginya kemasaman gambut. Selain itu kandungan unsur hara yang terdapat pada gambut juga menyebabkan banyaknya mikroorganisme yang hidup disana dan memiliki peranan seperti kemampuan proteolitik, selulolitik, dan juga penambat nitrogen.

Dewasa ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya tekanan dari para ahli dan pecinta lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah

satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri (Falch 1991). Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak beracun (Aunstrup *et al.* 1979).

Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Karena itu, enzim ini termasuk dalam enzim utama golongan hidrolase. Protease ialah enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisiko kimia dan sifat katalitik yang sangat bervariasi. Protease dapat dihasilkan secara ekstraseluler dan intraseluler dan mempunyai peranan penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward *et al.*, 2009).

Dalam dasa warsa terakhir ini terjadi peningkatan lebih pesat dalam pemakaian enzim karena sifatnya yang efisien, selektif, mengkatalisis reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan. Salah satu sumber protease adalah mikroba. Protease mikroba dapat diklasifikasikan sebagai protease serin (E.C. 3.4.21), protease sulfhydryl (E.C.3.4.22), protease asam (E.C.3.4.23)

dan metaloprotease (E.C.3.4.24). Beberapa mikroorganisme yang telah diketahui sebagai penghasil protease untuk aplikasi komersial adalah *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pyrococcus*, *Termonospora*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia* and *Aspergillus* (Rao, et al., 1998; Ward et al., 2009). Begitu pentingnya enzim ini sehingga perlu mencari enzim dari mikroba dengan habitat yang berbeda sehingga diharapkan enzim yang dihasilkan memiliki karakter yang unik untuk memenuhi kebutuhan industri baik industri produk pertanian, kimia dan medis. Salah satu sumber enzim ini adalah mikroba dari tanah gambut Banjarmasin. Mikroorganisme yang beraneka ragam ditemukan di tanah gambut dapat diaplikasikan untuk kepentingan penelitian yaitu mencari potensi mikroba tersebut dalam berbagai aspek seperti kesehatan, obat, pertanian dan lain sebagainya. Oleh karena itu penting dilakukan isolasi mikroba dari tanah gambut yaitu bakteri untuk didentifikasi dari segi morfologi yang kemudian akan dilanjutkan pada tahap proteolitik, dan potensi senyawa antimikroba.

II. BAHAN DAN METODE

A. Pengambilan Sampel

Sampel tanah gambut diambil di lokasi daerah gambut yaitu daerah di Banjarmasin Kalimantan Selatan.

B. Isolasi Bakteri Dari Tanah Gambut

Isolasi bakteri dari tanah gambut dilakukan dengan cara tanah di timbang sebanyak 2 Gr kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi NaCl 0,9% lalu dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-7} . Pada tiga pengenceran terakhir disebar pada media agar *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan pengamatan dan di hitung jumlah koloni yang tumbuh.

C. Uji Protease

Aktivitas proteolitik isolat diuji dengan menggunakan medium agar + susu skim 1%. Isolat ditumbuhkan pada media kultur cair di inkubator bergoyang selama semalam. Sebanyak 15 μL isolat dari kultur cair diteteskan ke paper disk. Kemudian paper disk tersebut di letakkan di atas media agar + susu skim lalu diinkubasi selama 24 jam. Nisbah antara diameter zona jernih terhadap diameter koloni (indeks proteolitik = IP). Isolat dengan $\text{IP} \geq 3,0$ dipilih dan disimpan pada suhu 4°C untuk digunakan pada uji selanjutnya (Cappucino & Sherman 2001).

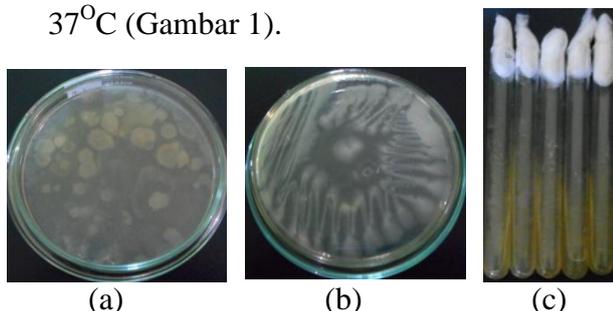
D. Identifikasi bakteri penghasil protease

Isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi dan memiliki kemampuan proteolitik diidentifikasi berdasarkan morfologi koloni dan morfologi sel.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Isolasi Mikroorganisme dari Tanah Gambut. Berdasarkan hasil isolasi bakteri dari tanah gambut diperoleh isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) sejumlah 180 isolat dengan lama pertumbuhan bakteri selama 24 jam ditumbuhkan dalam inkubator pada suhu 37°C (Gambar 1).



Gambar 1. (a) isolat bakteri hasil isolasi dengan teknik pengenceran dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-7} , (b) isolat bakteri hasil teknik gores empat, (c) isolat bakteri yang sudah dimurnikan.

Aktivitas Proteolitik. Isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi diuji kemampuan proteolitiknya pada media agar+susu skim 1%. Dari hasil uji diperoleh lima bakteri yang potensial sebagai penghasil protease, isolat tersebut yaitu isolat 3TG, 4TG, 5TG, 6TG dan 7TG hal ini terlihat dengan

adanya zona bening disekitar isolat (Gambar 2).



Gambar 2. isolat bakteri hasil isolasi dari tanah gambut yang mampu menghasilkan enzim protease.

Identifikasi bakteri penghasil protease.

Lima bakteri yang potensial penghasil protease diidentifikasi secara morfologi koloni dan morfologi sel dengan teknik pewarnaan Gram (Tabel 1).

Tabel 1. Karakter morfologi koloni dan morfologi sel bakteri hasil isolasi dari tanah gambut penghasil protease.

Karakter	Isolat Bakteri
Morfologi Koloni	
Bentuk	Bulat
Tepian	Licin, bergerigi, berombak
Elevasi	Cembung, cekung, datar
Warna	Putih, krem, kuning, orange, kuning transparan dan ungu
Morfologi Sel	
Bentuk Sel	Batang
Warna Sel	Merah dan ungu

B. Pembahasan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari teknik isolasi dengan media NA sebanyak 180 isolat bakteri tumbuh dengan baik pada suhu 37 °C selama 24 jam. hasil yang diperoleh sesuai dengan pendapat

Tate (2000) bahwa pada tanah masam (pH <7,0), populasi mikroba dalam tanah berkisar 10^4 per gram tanah artinya banyak mikroorganisme tumbuh baik pada tanah gambut yang memiliki potensi untuk bidang pertanian, farmakologi maupun industri lainnya. Isolat yang diperoleh dari hasil isolasi tanah gambut diberikan nama dengan isolat nomor isolat dan sampel yaitu isolat 1TG (Tanah Gambut).

Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim (Akhdia, 2003). Pada tanah yang memiliki karakteristik asam seperti lahan gambut, maka mikroba yang ada adalah mikroba kelompok asidofilik yang memegang peranan penting dalam proses dekomposisi berbagai bahan organik. Bakteri penambat N mempunyai kemampuan menambat nitrogen bebas (N_2) yang berasal dari udara dan merubahnya menjadi amonia (NH_3) yang kemudian diubah menjadi asam amino yang akan digunakan oleh tanaman untuk tumbuh dan berkembang (Alexander,

1977). Selain nitrogen, keberadaan fosfat di tanah hanya sedikit yang dapat digunakan oleh tanaman secara langsung. Jumlah P yang sangat rendah karena terikat menjadi Fe-fosfat dan Al-fosfat pada tanah masam atau $Ca_3(PO_4)_2$ pada tanah basa (Cunningham dan Kuyack, 1992). Bakteri selulolitik juga berperan penting, karena mampu merombak senyawa organik yang mengandung selulosa menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman.

Kemampuan proteolitik bakteri yang diisolasi dari tanah gambut ditunjukkan dengan zona bening yang terbentuk disekitar koloni yang menggunakan media NA dan susu skim 1%. Sebanyak lima isolat yang memiliki kemampuan proteolitik dengan kemampuan indeks proteolitik (IP) 3 atau lebih dari 3. Adanya protease ekstraseluler bakteri menyebabkan kandungan protein pada media NA terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino. Zona bening merupakan indikator bahwa isolat bakteri mampu memanfaatkan protein pada media sebagai sumber nutrisinya (Badriyah dan Ardyati, 2013).

Bakteri memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi pada fase logaritmik karena sel berada dalam kondisi optimum untuk metabolisme dan perkembangbiakan (Yunita, 2012). Hasil riset yang lain

menunjukkan bahwa aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri yang tertinggi terlihat pada fase stasioner yaitu seiring dengan pertumbuhan sel (Baehaki dan Budiman, 2011). Penelitian lain pada produksi protease bakteri didapatkan bakteri dengan waktu produksi protease optimum (48 jam) adalah *Bacillus subtilis* PE-11 (Adinarayana *et al*, 2003) dan *Bacillus licheniformis* Lbbl-11 (Olajuyigbe and Ajele 2008), hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan bahwa ke lima isolat yang menghasilkan zona bening disekitar koloni tumbuh optimum pada waktu 48 jam isolat tersebut adalah isolat 3TG, 4TG, 5TG, 6TG dan 7TG.

Berdasarkan uji karakteristik morfologi koloni dan sel, ke lima isolat tersebut memiliki bentuk bulat, bulat tidak beraturan, berombak, memiliki warna koloni putih, krem, kuning, orange, dan kuning transparan. Hasil dari uji Gram ke lima isolat tersebut yaitu isolat 3TG, 4TG, 5TG, dan 6TG termasuk Gram positif berbentuk batang dan isolat 7TG termasuk Gram negatif berbentuk batang.

Protease merupakan enzim perombak protein. Oleh karena itu, contoh tanah untuk keperluan isolasi bakteri proteolitik diambil dari tempat-tempat yang banyak mengandung protein seperti rumah pematangan hewan, tambak, dan tempat pembuangan susu rusak serta tanah

gambut yang kaya akan bahan organik. Sebanyak lima isolat bakteri diperoleh dari tanah gambut. Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium yang mengandung kasein, yang merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease dan menginduksi sintesis enzim protease alkalin (Ward 1983; Fujiwara dan Yamamoto 1987). Selain itu, protease juga merupakan enzim konstitutif atau inducibel parsial. Enzim konstitutif selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif disintesis bila ada induksi substrat dalam medium. Sintesis enzim induktif meningkat seiring peningkatan konsentrasi substrat terutama bila substratnya merupakan satu-satunya sumber karbon (Lidya dan Djenar, 2000).

Aktivitas enzim protease dipengaruhi oleh banyak faktor yaitu suhu, pH, konsentrasi media, waktu inkubasi. aktivitas protease semakin meningkat dengan bertambahnya suhu sampai suhu optimum tercapai, setelah itu kenaikan lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas protease menurun. Pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum, aktivitas enzim juga rendah, hal ini disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia. Energi tersebut dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik dari molekul enzim maupun dari molekul

substrat. Perubahan pH yang ekstrim, enzim dapat mengalami denaturasi akibat gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3 dimensi enzim (Hames dan Hooper, 2000). Vazquez *et al.* (2008) melaporkan protease *Pseudoalteromonas* sp strain P96-47 yang berasal dari laut Antartik memiliki pH optimum 7 - 9. Protease dari bakteri laut *Alteromonas* sp strain O-7 memiliki pH optimum 10 (Miyamoto *et al.*, 2002). Hasil dari penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa ke lima isolat tersebut mampu menghasilkan protease karena pengaruh media yang digunakan, pH media, dan suhu pertumbuhan optimum.

IV. KESIMPULAN

Lima isolat yang berhasil diisolasi dari tanah gambut menggunakan media NA memiliki kemampuan proteolitik yang dibuktikan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni pada media NA dan susu skim 1%. Isolat tersebut adalah 3TG, 4TG, 5TG, 6TG, dan 7TG yang termasuk Gram positif bentuk sel batang (3TG, 4TG, 5TG, 6TG) dan Gram negatif bentuk sel batang untuk isolat 7TG.

DAFTAR PUSTAKA

Adinarayana K, Sllaiah P, Prasad DS. 2003. Production and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a

- newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech.* 4:E56-64.
- Adinogroho WC, Suharjo BH, Labueni S, Surydiputra. 2005. *Panduan Pengendalian Kebakaran Hutan dan Lahan Gambut.* Bogor. WIIP.
- Akhdiya A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah.* Vol.9 (2):38-44.
- Aunstrup, K.O., O. Andressen, E.A. Falch, and T.K. Nielsen. 1979. Production of microbial enzymes. In: Pepples, H.J and D. Perlman (Eds.). *Microbial Technology.* Vol. 1. Academic Press Inc., New York.
- Badriyah IB dan Ardyati T. 2013. Deteksi Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri Asal Ampas Tahu Pada Substrat Bekatul. *Jurnal Biotropika* Vol. 1 (3): 109-113.
- Baehaki A, Rinto, Budiman A. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya Sumatera Selatan. *J. Teknol. dan Industri Pangan,* Vol. XXII (1):37-42.
- Cappuccino JG and Sherman. 2001. *Microbiology: A Laboratory Manual.* Addison-Wesley: USA.
- Cunningham JE. and C Kuiack. 1992. Production Of Citric and Oxalic Acid and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilail.* *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1451-1458
- Darjamuni, 2003. *Siklus Nitrogen di Laut,* Program Study Pengelolaan Sumberdaya Pesisir dan Lautan Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Falch, E.A. 1991. Industrial enzyrres developments in production and application. *Biotech. Adv.* 9:643-658.
- Fujiwara, N. and K. Yamamoto. 1987. Production of alkaline protease in low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. *J. Fenrment. Technol.* 65(3):345-348.

- Hakim, N, Nyakpa, MY, Lubis, AM, Nugroho, SG, Saul, R, Diha, A, Hong, & GB, Bailey, 1986, *Dasar-Dasar Ilmu Tanah*, Penerbit Universitas Lampung
- Hames BD, Hooper NM. 2000, *Biochemistry: The Instant Notes*. Ed.ke-2. Hongkong:Springer-Verlag.
- Lidya & Djenar. 2000. *Dasar Bioproses* Direktorat Pembinaan dan Fenolinin dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional: Jakarta.
- Miyamoto K, Tsujibo H, Nukui E, Itoh H, Kaidzu Y, Inamori Y. 2002. Isolation and characterization of the genes encoding two metalloproteases (MprI and MprII) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(2):416-21.
- Muslihat L. 2003. Teknik pengukuran tanah gambut di lapangan dan di laboratorium. Bogor. *Buletin Teknik Pertanian*. 8:69.
- Olajuyigbe FM, Ajele JO. 2008. Some properties of extracelullar protease from *Bacillus licheniformis* Lbb1-1 isolated from 'iru', a traditionally fermented African locust bean condiment. *Glob. J. Biotechnol. Biochem*. 3 (1): 42-46.
- Rao MM, Tanksale AM, Gatge MS, Desphande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 62(3):597-635.
- Vázquez SC, Hernández E, Cormack WPM. 2008. Extracellular proteases from the Antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. *Revista Argentina de Microbiologia* 40:63-71.
- Ward, O.P. 1983. *Proteinases*. In Fogarty, W.M. (Ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnolgy*. Applied Science Publishers. London. p. 251-290.
- Ward OP, Rao MB, Kulkarni A. 2009. Proteases production. *Appli.Microbiol. Industrial* 495-511.
- Yunita, S. P. 2012. Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan. Biologi. *Jurnal Skripsi* Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga..