

Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil

Alina Akhdiya

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor

ABSTRACT

In the effort of obtaining indigenous alkaline thermostable protease producing bacteria, 17 different soil samples collected from slaughterhouses, fish ponds along the Nusa Tenggara, and spoiled milk disposal sites in Boyolali (Central Java) for microbial isolation. Out of the 1004 colonies obtained, 29 isolates showed proteolytic index ≥ 3.00 . Enzymatic assay on these isolates resulted in two isolates (BYL-15 and BYL-28) with highest crude enzyme activity, this activity was also higher than that achieved by the standard bacteria (*Bacillus firmus* NRRL B-1107). After 36 hours of incubation, crude enzyme activity and specific activity of isolate BYL-15 were 106.45 U/ml filtrate and 5069.04 U/mg protein, respectively (at 50°C and pH 10.5). Whereas for isolate BYL-28 the crude enzyme activity and specific activity were 100.00 U/ml filtrate and 5,263.15 U/mg protein, respectively. The activity of these two isolates were about 10 times higher than that of the *B. firmus* (11.259 U/ml filtrate), whereas their specific activities were about 40 times than that of *B. firmus* (119.78 U/mg protein). Further studies showed that the proteolytic activity of these two isolates were still increased when assayed at 60°C, and more than one peak of activity were obtained when assayed at different pH values (8.5-12). Based on microscopic observations, these two isolates showed cell morphology characteristics of *Actinomyces*.

Key words: Alkaline thermostable protease, isolation, *Actinomyces*.

ABSTRAK

Dalam upaya menggali galur-galur bakteri penghasil enzim protease alkalin termostabil asli Indonesia, telah dilakukan isolasi mikroorganisme dari 17 contoh tanah yang diambil dari beberapa rumah pemotongan hewan dan tambak di Nusa Tenggara, serta tempat pembuangan susu rusak di Boyolali (Jawa Tengah). Dari 1004 isolat yang diperoleh, 29 di antaranya memiliki indeks proteolitik $\geq 3,00$. Pengukuran terhadap aktivitas enzim isolat-isolat tersebut menghasilkan isolat BYL-15 dan BYL-28 yang memiliki aktivitas enzim kasar yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri pembanding (*Bacillus firmus* NRRL B-1107). Aktivitas enzim kasar dan aktivitas spesifik isolat BYL-15 setelah 36 jam berturut-turut adalah 106,45 U/ml filtrat biakan dan 5069,04 U/mg pada suhu 50°C dan pH 10,5. Aktivitas enzim kasar dan aktivitas spesifik isolat BYL-28 adalah 100,00 U/ml filtrat biakan dan 5263,15 U/mg

pada kondisi yang sama. Nilai aktivitas enzim kedua isolat tersebut ± 10 kali lebih besar daripada *B. firmus* (11,259 U/ml filtrat), sedangkan aktivitas spesifiknya 40 kali lebih besar daripada *B. firmus* (119,78 U/mg protein). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa aktivitas enzim kasar kedua isolat tersebut masih terlihat meningkat pada suhu 60°C dan memiliki lebih dari satu puncak aktivitas pada beberapa pH yang dicoba (8,5-12,0). Berdasarkan ciri-ciri morfologi yang diperoleh dari pengamatan mikroskopis, kedua isolat tersebut termasuk anggota *Actinomyces*.

Kata kunci: Protease alkalin termostabil, isolasi, *Actinomyces*.

PENDAHULUAN

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).

Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease di antaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan limbah (Moon dan Parulekar 1993). Oleh karena itu, tidak mengherankan apabila protease yang digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia (Ward 1985). Protease alkalin merupakan jenis protease yang paling banyak diaplikasikan dalam bidang industri.

Nilai perdagangan enzim dunia mencapai 3-4 miliar dolar per tahun, 4-5 juta dolar di antaranya dari pasar Indonesia yang keseluruhannya diimpor dari negara-negara produsen enzim (Rajasa 2003). Pasar yang luas dan sumber daya alam yang mendukung merupakan peluang berharga bagi pengembangan industri enzim di Indonesia.

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.

Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, penggalan mikroorganisme indigenous penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia. Keragaman hayati yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Seleksi Awal Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil

Mikroorganisme diisolasi dari 17 contoh tanah yang diambil di beberapa lokasi di Nusa Tenggara dan Jawa Tengah (Tabel 1).

Isolasi dan seleksi dilakukan berdasarkan metode yang dipakai Durham *et al.* (1987). Seluruh media yang digunakan memiliki pH 10,2. Inkubasi dilakukan pada suhu 50°C. Isolat yang telah murni disimpan dalam medium penyimpanan pada suhu 4°C, selanjutnya secara serentak *ditotol* ulang pada medium agar susu skim untuk diukur diameter koloni dan zona jernihnya. Nisbah antara diameter zona jernih terhadap diameter koloni (indeks proteolitik = IP). Isolat dengan IP $\geq 3,0$ dipilih dan disimpan pada suhu 4°C sebagai bahan percobaan berikutnya.

Sebagai bakteri pembanding digunakan *Bacillus firmus* NRRL B-1107 yang diperoleh dari

Tabel 1. Asal contoh tanah sumber isolat.

| Kode | Propinsi | Kabupaten | Keterangan |
|-------|----------|-----------|-----------------------|
| 11013 | NTT | Manggarai | RPH |
| 21013 | NTT | Ngada | RPH |
| 21014 | NTT | Ngada | RPH |
| 21015 | NTT | Ngada | RPH |
| 21016 | NTT | Ngada | RPH |
| 21017 | NTT | Ngada | RPH |
| 31011 | NTT | Ende | RPH |
| 31021 | NTT | Ende | RPH |
| 31013 | NTT | Ende | RPH |
| 31014 | NTT | Ende | RPH |
| 41011 | NTT | Sikka | RPH |
| 41012 | NTT | Sikka | RPH |
| 41013 | NTT | Sikka | RPH |
| 41014 | NTB | Sikka | Tambak |
| 11022 | NTB | Bima | Tambak |
| 11023 | NTB | Bima | Tambak |
| 11111 | JTN | Boyolali | Sumur Pembuangan Susu |

NTT = Nusa Tenggara Timur, NTB = Nusa Tenggara Barat, JTN = Jawa Tengah, RPH = rumah pematongan hewan.

Northern Utilization Research and Development Division of the US Department of Agriculture, Peoria, Illinois. Bakteri ini merupakan mesofil, untuk menumbuhkannya digunakan suhu inkubasi 37°C.

Penyiapan Inokulum

Sebanyak satu lup inokulasi biakan murni yang berasal dari medium penyimpanan diinokulasikan ke dalam 10 ml medium cair. Medium yang telah diinokulasi tersebut dikocok pada suhu 50°C selama 48-72 jam dengan alat pengocok horizontal (Taiyo Incubator M-100N, Japan) pada kecepatan 120 ekskursi per menit.

Penyiapan Sumber Enzim

Sebanyak 50 ml medium fermentasi cair diinokulasi dengan 1,5 ml inokulum ($\pm 3,5 \times 10^9$ sel/ml atau CFU bergantung pada organismenya), kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 36 jam sambil dikocok dengan cara yang sama seperti di atas. Biakan disentrifugasi (Hitachi SCP-85H, Japan) pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 g selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim dan kandungan protein.

Pengukuran Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan metode Horikoshi (1971). Kandungan protein diukur dengan metode Bradford (1976) Pengukuran protein hanya dilakukan terhadap filtrat biakan isolat terbaik dan bakteri pembanding (*B. firmus* NRRL 8-1107).

Pengukuran Biomassa

Pelet sel dicuci dengan akuades lalu dikeringkan dalam oven 50°C sampai beratnya konstan. Pengukuran berat kering hanya dilakukan terhadap sembilan isolat terpilih.

Identifikasi Terbatas Isolat yang Diperoleh

Untuk memberikan informasi tambahan tentang isolat terpilih dilakukan identifikasi terbatas yang meliputi pengamatan morfologi koloni dan sel, pewarnaan Gram, pengujian katalase, hidrolisis gelatin, hidrolisis pati, suhu pertumbuhan, dan kemampuan tumbuh pada nutrisi agar + NaCl.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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 pemotongan hewan, tambak, dan tempat pembuangan susu rusak. Sebanyak 1004 isolat bakteri diperoleh dari 17 contoh tanah yang dianalisis (Tabel 2).

Selain pemilihan sumber isolat, hasil yang akan diperoleh juga bergantung pada metode dan kondisi yang digunakan dalam isolasi, seperti komposisi dan pH medium (Ogrydziak 1993).

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).

Seluruh tahap inkubasi pada proses isolasi dan seleksi dilakukan pada suhu tinggi (50°C). Kombinasi pH dan suhu tinggi ini dimaksudkan

Tabel 2. Perolehan isolat dari contoh tanah yang dianalisis

| Kode contoh tanah | Isolat | | | | |
|-------------------|-----------|---------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| | Diperoleh | IP ^a ≥ 3 | 3 < IP ^a < 1.5 | IP ^a ≤ 1.5 | TZ ^b |
| 11013 | 15 | 2 | 13 | 0 | 0 |
| 21013 | 80 | 0 | 17 | 14 | 49 |
| 21014 | 21 | 0 | 8 | 1 | 12 |
| 21015 | 70 | 1 | 15 | 7 | 47 |
| 21016 | 68 | 0 | 3 | 65 | 0 |
| 21017 | 64 | 2 | 5 | 6 | 51 |
| 31011 | 187 | 2 | 56 | 100 | 29 |
| 31021 | 60 | 1 | 26 | 25 | 8 |
| 31013 | 44 | 1 | 12 | 31 | 0 |
| 31014 | 134 | 5 | 60 | 13 | 56 |
| 41011 | 30 | 0 | 25 | 5 | 0 |
| 41012 | 42 | 0 | 0 | 42 | 0 |
| 41013 | 30 | 2 | 7 | 21 | 0 |
| 41014 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 11022 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 11023 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 |
| 11111 | 105 | 13 | 11 | 66 | 15 |
| Total isolat | 1004 | 29 | 258 | 450 | 267 |

^aIP = indeks proteolitik, ^bTZ = tidak membentuk zona jernih di sekitar koloni.

agar bakteri proteolitik yang terjaring adalah penghasil enzim protease yang memiliki aktivitas optimum dan stabilitas tinggi pada pH dan suhu tinggi.

Hasil pencirian kemampuan proteolitik pada medium agar susu skim menunjukkan 737 isolat membentuk zona jernih di sekitar koloni, sebanyak 29 isolat di antaranya memiliki IP 3,00 atau lebih, 708 isolat dengan IP kurang dari 3,0, dan 267 isolat tidak membentuk zona jernih di sekitar koloni. Sebanyak 29 isolat dipilih untuk diseleksi lebih lanjut (Tabel 3).

Seleksi dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim protease dalam filtrat biakan umur 36 jam. Untuk menentukan waktu inkubasi dilakukan pengukuran aktivitas enzim sembilan isolat (dipilih secara acak dari 29 isolat terpilih) setiap 12 jam sekali. Ternyata, enam isolat di antaranya menunjukkan aktivitas tertinggi setelah 36 jam inkubasi.

Hasil pengukuran aktivitas protease kasar ini berkisar antara 0,087-106,450 U/ml filtrat biakan (Tabel 4). Isolat BYL-15 dan BYL-28 menunjukkan aktivitas enzim tertinggi, masing-masing 106,450 U/ml dan 100,00 U/ml filtrat biakan.

Puncak produksi enzim protease alkalin termostabil umumnya terjadi pada akhir fase eksponensial sampai akhir fase statis (Durham *et al.*

Tabel 3. Aktivitas enzim protease kasar dari 29 isolat terpilih.

| Kode isolate | Aktivitas enzim kasar (U/ml filtrat) |
|--------------|--------------------------------------|
| BYL-15 | 106,450 |
| BYL-28 | 100,000 |
| SIK-06 | 1,928 |
| SIK-04 | 1,804 |
| BYL-12 | 1,773 |
| BYL-03 | 1,720 |
| BYL-05 | 1,701 |
| BYL-18 | 1,472 |
| BYL-04 | 1,124 |
| END-01 | 1,107 |
| MGR-01 | 0,758 |
| END-02 | 0,737 |
| BYL-01 | 0,676 |
| END-03 | 0,608 |
| BYL-22 | 0,604 |
| BYL-09 | 0,595 |
| BYL-29 | 0,513 |
| END-04 | 0,481 |
| END-05 | 0,369 |
| MGR-02 | 0,328 |
| END-06 | 0,303 |
| BJT-01 | 0,287 |
| BYL-19 | 0,260 |
| BJT-02 | 0,253 |
| END-07 | 0,246 |
| END-08 | 0,190 |
| END-09 | 0,185 |
| BJT-03 | 0,131 |
| BYL-16 | 0,087 |
| NRRL B-1107 | 11,259 |

Tabel 4. Aktivitas enzim dan biomassa sel BYL-15 dan BYL-28 selama 48 jam inkubasi.

| Umur (jam) | Biomassa (10 ⁻¹ mg/ml filtrat) | | Aktivitas enzim kasar (U/ml filtrat) | |
|------------|--|--------|---|---------|
| | BYL-15 | BYL-28 | BYL-15 | BYL-28 |
| 0 | 4,0 | 2,0 | Td | Td |
| 12 | 12,0 | 4,0 | 0 | 0 |
| 24 | 31,2 | 16,0 | 14,284 | 4,604 |
| 36 | 32,0 | 17,2 | 116,308 | 106,259 |
| 48 | 32,0 | 18,0 | 7,946 | 19,526 |

Td = tidak diukur.

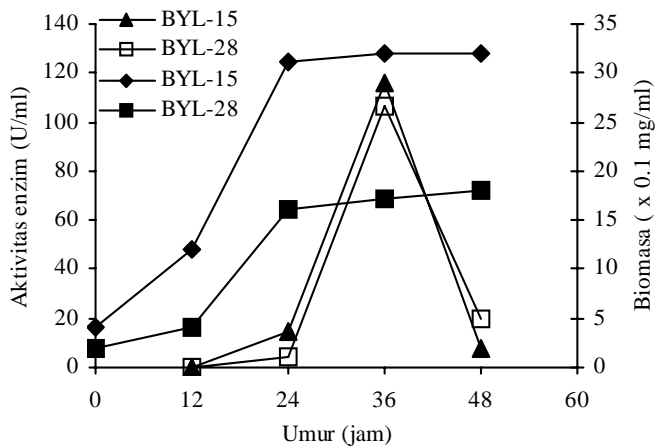
1987; Tsuchiya *et al.* 1991; Manachini *et al.* 1988; Kole *et al.* 1988; Kubo *et al.* 1988). Pada genus *Bacillus*, sintesis protease netral dan alkalin biasanya terjadi pada akhir fase eksponensial dan fase statis (Votruba *et al.* 1987). Pengetahuan mengenai waktu produksi ini penting artinya untuk mendapatkan hasil maksimum. Oleh karena itu, perlu dilakukan percobaan untuk menentukan waktu pemanenan yang tepat.

Pengukuran biomassa dan aktivitas enzim yang dihasilkan setiap 12 jam selama 48 jam (Tabel 4 dan Gambar 1) menunjukkan puncak produksi enzim protease alkalin paling tinggi oleh kedua isolat tersebut terjadi pada fase statis. Tsuchiya *et al.* (1991) melaporkan bahwa pola seperti ini juga dijumpai pada *Thermoactinomyces* sp. HS682. Pola produksi enzim seperti itu terjadi karena selama fase pertumbuhan eksponensial sel mengalami represi katabolit, sehingga sintesis eksoenzimnya terhambat. Pada fase statis, represi katabolit terangkat, sehingga biosintesis eksoenzim meningkat (Priest 1985).

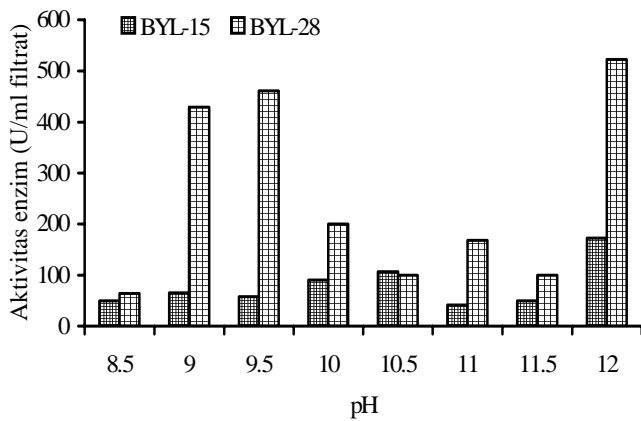
Suhu optimum aktivitas enzim protease dari BYL-15 dan BYL-28 belum dapat ditetapkan karena sampai suhu tertinggi yang dicoba (60°C) aktivitasnya masih meningkat (Tabel 5 dan Gambar 2). Walaupun demikian, dari data tersebut dapat diketahui bahwa protease yang dihasilkan oleh BYL-15 dan BYL-28 merupakan protease alkalin yang aktif pada suhu tinggi. Hasil pengukuran enzim pada berbagai pH untuk isolat BYL-28 (Tabel 5 dan Gambar 3) memperlihatkan dua titik puncak aktivitas, yaitu pada pH 9,5 dan satu titik yang belum diketahui. Untuk enzim BYL-15 ada satu titik puncak, yaitu pada pH 10,5 dan satu titik yang belum diketahui. Oleh karena itu, diduga kedua isolat menghasilkan lebih dari satu jenis enzim protease alkalin termos-tabil.

Aktivitas enzim yang protease alkalin termos-tabil dari isolat BYL-15 dan BYL-28 cukup tinggi, yaitu ± 10 kali dari aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *B. firmus* NRRL B-1107 (Tabel 3). Bahkan aktivitas spesifiknya mencapai lebih dari 40 kali aktivitas spesifik protease bakteri pembanding (Tabel 6).

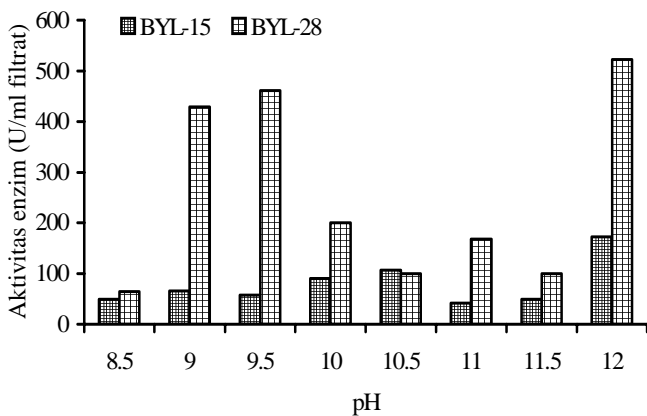
Berdasarkan hasil pengamatan reaksi Gram, morfologi sel, dan pengujian katalase, 16 dari 29 isolat adalah *Bacillus* karena memiliki sel vegetatif berbentuk batang, membentuk endospora, dan bersifat katalase positif (Gordon 1989). Sedangkan 13 isolat lainnya (termasuk BYL-15 dan BYL-28) adalah *Actinomycetes*, karena bersifat katalase positif, Gram positif, sel-selnya berbentuk filamen bercabang dengan diameter $\leq 1 \mu\text{m}$ dan menghasilkan spora pada miselium udara (Madigan *et al.* 2000; Lechevalier dan Pine 1989).



Gambar 1. Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease kasar yang dihasilkan isolat BYL-15 dan BYL-28.



Gambar 2. Aktivitas enzim kasar BYL-15 dan BYL-28 pada suhu 40°C, 50°C, dan 60°C.



Gambar 3. Aktivitas enzim kasar BYL-15 dan BYL-28 pada berbagai pH.

Tabel 5. Aktivitas enzim kasar BYL-15 dan BYL-28 pada berbagai pH.

| Aktivitas enzim (U/ml filtrat) | | | | | |
|--------------------------------|------|--------|---------|------|---------|
| 50°C | | | pH 10,5 | | |
| BYL-15 | pH | BYL-28 | BYL-15 | Suhu | BYL-28 |
| 50,00 | 8,5 | 64,52 | | 40°C | 200,00 |
| 66,13 | 9,0 | 429,03 | 132,6 | | |
| 58,07 | 9,5 | 461,29 | | 50°C | 100,00 |
| 90,33 | 10,0 | 200,00 | | | |
| 106,45 | 10,5 | 100,00 | 106,5 | | |
| 41,94 | 11,0 | 167,74 | | | |
| 50,00 | 11,5 | 100,0 | | 60°C | 1419,36 |
| 172,58 | 12,0 | 522,8 | 609,8 | | |

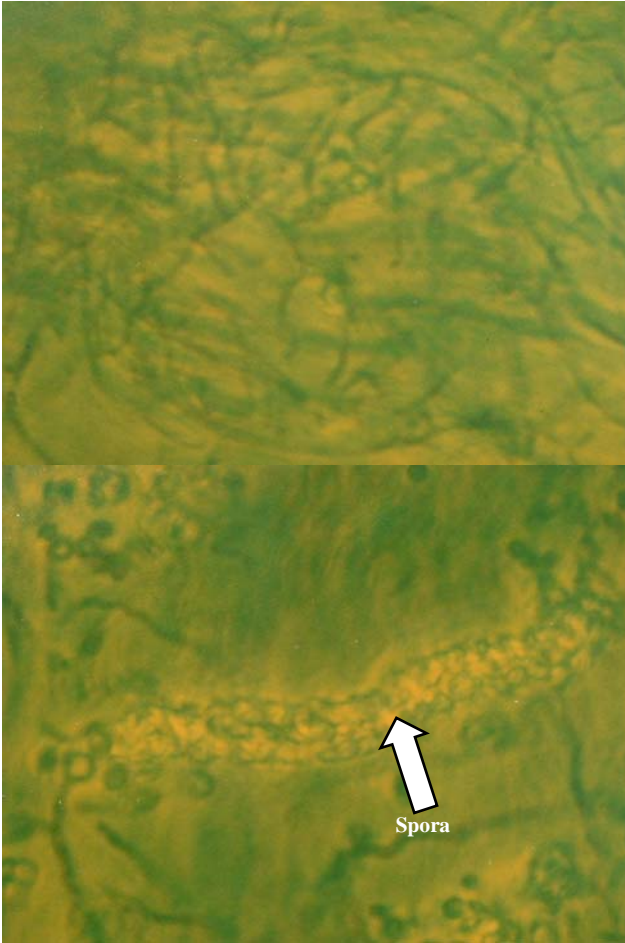
Tabel 6. Kadar protein filtrat biakan dan aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim kasar BYL-15 dan BYL-28*

| Isolat | Kadar protein filtrat (mg/ml) | Aktivitas enzim kasar (U/ml filtrat) | Aktivitas spesifik enzim kasar (U/mg protein) |
|-------------|-------------------------------|--------------------------------------|---|
| BYL-15 | 0,021 | 106,45 | 5069,04 |
| BYL-28 | 0,019 | 100,00 | 5263,15 |
| NRR1 B-1107 | 0,094 | 11,26 | 119,78 |

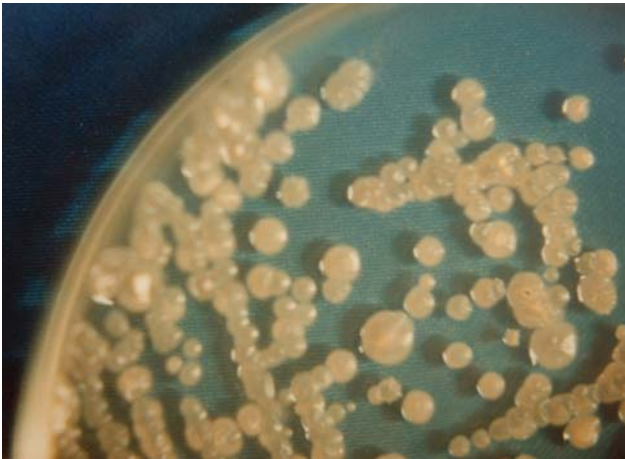
*diukur pada filtrat biakan umur 36 jam.

Isolat BYL-15 dan BYL-28 juga mampu menghidrolisis pati dan gelatin, tumbuh pada agar nutrisi yang mengandung NaCl sampai 7%. Morfologi sel dan koloni kedua isolat ini sama (Gambar 4 dan 5). Koloni kedua isolat melekat erat pada medium, berbentuk bulat, berwarna putih, cembung, tampak seperti kerak putih, dan kasar apabila sudah tua (Gambar 5). Kedua isolat tersebut tidak tumbuh pada suhu 45-60°C. Dilihat dari kisaran suhu pertumbuhan, kedua isolat tersebut dapat digolongkan sebagai bakteri termofil.

Dalam industri fermentasi penggunaan mikroorganisme termofilik lebih menguntungkan, terutama karena dapat mengurangi risiko kontaminasi. Selain itu, juga dapat mengurangi biaya untuk kebutuhan pendingin fermentor. Ditinjau dari karakteristik enzimnya, kedua isolat sangat potensial untuk dikembangkan sebagai sumber gen protease alkalin termostabil maupun penghasil enzim itu sendiri.



Gambar 4. Morfologi sel isolat BYL-15.



Gambar 5. Morfologi koloni isolat BYL-15.

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolat *Actinomycetes* BYL-15 dan BYL-28 merupakan bakteri penghasil enzim protease alkalin termostabil yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai sumber gen maupun penghasil enzim itu sendiri. Diduga kedua isolat ini menghasilkan lebih dari satu jenis enzim protease alkalin termofil. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memurnikan dan karakterisasi enzim murninya. Produksi enzim protease alkalin termofil kedua isolat mencapai puncak pada fase statis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Yayasan Darma Bakti Kalbe yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Bradford, M.M., 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.
- Durham, D.R., D.B. Stewart, and E.J. Stellwag. 1987. Novel alkaline and heat stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J. Bacteriol.* 169(6):2762- 2768.
- 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. Ferment. Technol.* 65(3):345-348.
- Gordon, R.E. 1989. The genus *Bacillus*. *In* Leary, W.O. (*Ed.*). Practical Handbook of Microbiology. CRC Press. Boston. p. 109-126.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by aikalophilic microorganism alkaline protease produced by *Bacillus* No.221. *Agric. BioI. Chem.* 35(9):1407-1414.
- Kole, M.M., I. Draper, and D.F. Gerson. 1988. Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen controlled,

- glucose fed-batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:404-400.
- Kubo, M., K. Murayama, K. Seto, and T. Imanaka. 1988. Highly thermostable neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Ferment. Technol.* 66(1):13-17.
- Lechevalier, H.A. and L. Pine. 1989. The actinomycetales. *In* Leary, W.O. (Ed.). *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press. Boston.
- Madigan, T., J.M. Martinko, and J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall International Inc., New Jersey.
- Manachini, P.L., M.G. Fortina, and C. Parini. 1988. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermorubber* as a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:409-413.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar. 1993. Some observation on protease producing in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. *Biotech. Bioeng.* 41:43-54.
- Ogrydziak, D.M. 1993. Yeast extracellular proteases. *Cri. Rev. Biotech.* 13(1):1-55.
- Priest, F.G. 1985. Extracellular enzymes. *In* Young, M.M. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture, and Medicine*. Vol. I. Pergamon Press. Oxford. p. 587-604.
- Rajasa, H. 2003. Pidato pembukaan 3rd conference on industrial enzyme and biotechnology. *Technology and Business Opportunity for Industrial Enzyme in Harmony with Environment*. BPPT. Jakarta, 6-7 Oktober 2003.
- Tsuchiya, K., H. Sakashita, Y. Nakamura, and T. Kimura. 1991. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agric. Biol. Chem.* 55(12):3125- 3127.
- Votruba, J., J. Pazlarova, M. Dvarakova, K. Vanatalu, L. Vachava, M. Starnadova, H. Kucerova, and J. Chaloupka. 1987. External factors involved in regulation of an extracellular proteinase synthesis in *Bacillus megaterium*: the effect of glucose and amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:373-377.
- Ward, O.P. 1983. Proteinases. *In* Fogarty, W.M. (Ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers. London. p. 251-290.
- Ward, O.P. 1985. Proteolytic enzymes. *In* Young, M.M. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology: The principles, Applications, and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Vol. 3. Pergamon Press. Oxford.