

Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu

Amin Fatoni, Zufahair, Puji Lestari

Program Studi Kimia, Jurusan MIPA, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman
Jl. Dr. Soeparno 56 Karangwangkal, Purwokerto, Jawa Tengah

Diterima 30-08-2007

Disetujui 15-02-2008

ABSTRACT

Protease has been used in large application industrial process such as detergent, leather, textil, softdrink, and medicine. In order to find unique protease, many substances were explored as proteases of bacteria sources. In this study, tofu liquid waste was used as a source of bacteria producing proteases. Waste sample was growth in skim milk agar medium showing proteases activity, it was used to produce extracellular protease. The microbial colonies were identified as *Staphylococcus* sp. Protease was extracted with 5000 g centrifugation at 4°C, and purified with ammonium sulphate precipitation continued with dialysis. Optimum production time, pH, metal ion, EDTA, specific activity, K_M , and V_{maks} were studied for enzyme characterization. Volume of crude enzyme was 300 ml, with spesific activity of 3.55 U/mg. Protease obtained from 60% ammonium sulphate fraction had the highest specific activity of 68.22 U/mg. Study on the protease characterization revealed that optimum temperature of this enzyme was 40°C. The optimum pH of the enzyme was found to be 8.0. The kinetic parameters K_M dan V_{maks} with casein as substrate were 0.31% and 51.55 U/ml. Some inhibitory effect was observed in the presence of EDTA, Cu^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , and enzyme activity was stimulated by Mg^{+2} , indicating that this ion had a functional role in the molecular structure of the enzyme.

Keywords: Extracellular proteases, *Staphylococcus* sp, tofu liquid waste

PENDAHULUAN

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease (protease serin, protease sistein/tiol, protease aspartat dan protease logam) adalah enzim yang banyak digunakan dalam industri, misalnya industri farmasi, kulit, detergen, makanan dan pengolahan limbah (Pastor *et al*, 2001; Ward 1985). Protease yang digunakan di dalam industri jumlahnya sekitar 60% dari penjualan enzim di dunia (Nunes *et al*, 2001; Singh *et al*, 2001; Zeikus *et al*, 1998).

Protease dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti bakteri, jamur, tanaman dan hewan (Ohta *et al*, 1966). Protease dari bakteri merupakan jumlah yang paling banyak dibandingkan dengan sumber lain, yaitu protease dari tumbuhan dan hewan. Protease bisa diisolasi dari bagian ekstrasel dan intrasel (Michael *et al*, 1998). Bakteri penghasil protease, khususnya protease ekstraseluler banyak diproduksi oleh spesies *Bacillus*.

Pentingnya protease dan tingginya daya jual enzim ini, mendorong para ilmuwan untuk mencari sumber-sumber protease baru yang bersifat produktif yakni yang memiliki aktivitas tinggi dan K_M kecil. Dewasa ini, para ilmuwan mulai memanfaatkan limbah sebagai sumber mikroorganisme penghasil protease (Yun 2006). Salah satu jenis limbah yang dihasilkan oleh industri pangan adalah limbah dari industri tahu, makanan yang telah lama dikenal masyarakat Indonesia dan merupakan sumber protein yang relatif murah serta proses pembuatannya mudah.

Industri tahu menghasilkan dua macam limbah yaitu limbah padat dan limbah cair. Limbah padat berupa ampas tahu yang diperoleh pada saat ekstraksi susu kedelai (penyaringan), sedangkan limbah cair dihasilkan setelah koagulasi protein susu kedelai dan pada saat proses pengepresan atau pencetakan tahu. Limbah cair tahu mengandung 9% protein, 0.69% lemak, dan 0.05% karbohidrat (Triyono & Hasanudin 1998). Komponen nutrisi lengkap dari limbah cair tahu yang masih mengandung protein dengan kadar tinggi memungkinkan mikroorganisme penghasil protease tumbuh di dalamnya (Sulistyaningtyas 2006).

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi protease ekstraseluler bakteri yang diisolasi dari limbah cair industri tahu. Karakterisasi protease meliputi penentuan pH dan suhu optimum, penentuan pengaruh ion logam, EDTA terhadap aktivitas protease serta penentuan nilai V_{maks} dan K_M .

BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan. Limbah cair tahu dari industri tahu di Desa Kalisari, Kecamatan Cilongok, Kabupaten Banyumas. Medium NA (agar 15 g, beef ekstrak 3 g, peptone 5 g, akuades 1 l), NB (beef ekstrak 3 g, peptone 5 g, akuades 1 l) dan SMA (skim milk 100 g, agar 15 g, akuades 1 l); tabung selofan, pereaksi Lowry; NaCl 1% (b/v); $(NH_4)_2SO_4$; asam asetat; EDTA; kasein *Hamerstein* 0,5% (b/v); larutan bufer; TCA 3,5% (b/v); $CoSO_4$; $ZnSO_4$; $CuSO_4$; $MgSO_4$; alkohol 70% (v/v) dan akuades. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, autoklaf, inkubator, kompor listrik, sentrifuge, alat pengocok horizontal (Kotterman), pH meter, pipet mikro, dan spektrofotometer UV-Vis.

Isolasi bakteri penghasil protease. Sampel limbah cair tahu diinokulasikan ke dalam medium NB, dan diinkubasi 48 jam pada kondisi yang sesuai habitat asal. Sebanyak 0,1 ml sampel dari medium pengayaan ditumbuhkan secara sebaran pada medium NA dan diinkubasi 48 jam, selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada medium NA. Koloni yang menunjukkan kenampakan yang berbeda ditumbuhkan pada medium NA secara goresan dan diinkubasi pada suhu sesuai habitat asal selama 48 jam untuk mendapatkan isolat murni (koloni tunggal).

Penapisan kualitatif kemampuan isolat dalam menghasilkan protease. Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein ditandai dengan pembentukan zona jernih. Caranya satu ose koloni digoreskan pada medium SMA. Piaraan diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan habitat asal selama 48 jam dan diamati terbentuknya zona jernih pada masing-masing koloni. Koloni yang membentuk zona jernih merupakan penghasil protease dan digunakan untuk penelitian selanjutnya meliputi identifikasi dan produksi ekstrak enzim kasar protease.

Identifikasi bakteri. Uji biokimia dan uji morfologi (pengamatan sel) dilakukan untuk identifikasi bakteri. Uji biokimia meliputi uji katalase, uji oksidase, dan uji reduksi nitrat. Bakteri ditumbuhkan dalam medium

tumbuh untuk mengetahui jenis bakteri tersebut. Bakteri selanjutnya diidentifikasi melalui serangkaian uji biokimiawi dan uji morfologi. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman Purwokerto.

Pembuatan inokulum. Inokulum dibuat dengan cara memindahkan 1 ose bakteri yang telah diremajakan ke dalam 25 ml medium inokulum (NB), kemudian dikocok dengan alat pengocok horizontal (Kotterman) skala 8 selama 24 jam.

Penentuan waktu produksi optimum protease. Medium inokulum sebanyak 5% (v/v) dipindahkan secara aseptis ke dalam 100 ml medium cair (NB), kemudian dikocok dengan alat pengocok horizontal (Kotterman) skala 8 pada suhu kamar selama 48 jam. Waktu produksi optimum enzim ditentukan dengan melakukan uji aktivitas ekstrak enzim kasar pada jam ke-6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48. Waktu produksi optimum yang diperoleh digunakan untuk produksi enzim protease.

Produksi Protease. Produksi protease dilakukan dengan cara memindahkan 5% (v/v) inokulum ke dalam 300 mL medium produksi (NB). Medium produksi selanjutnya diinkubasi selama waktu produksi optimum pada suhu kamar.

Ekstraksi dan pemurnian protease. Protease ekstraseluler diperoleh dengan sentrifugasi medium produksi pada kecepatan 5.000 g pada suhu 4°C, selama 15 menit. Supernatan berupa ekstrak enzim kasar dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat dengan konsentrasi 15, 30, 45, dan 60% jenuh. Ekstrak enzim kasar diukur volumenya, ditambah x gram amonium sulfat sampai konsentrasi akhir 15% jenuh (b/v), kemudian disentrifugasi. Supernatan ditampung, sedangkan endapan yang tertinggal dilarutkan dengan 5 ml NaCl 1% (b/v) dan disimpan pada suhu 4°C sebagai fraksi endapan 15% (FE-15%). Supernatan ditambahkan lagi amonium sulfat sampai konsentrasi akhir 30% jenuh dan disentrifugasi lagi. Supernatan ditampung, sedangkan endapan yang tertinggal dilarutkan dengan 5 ml NaCl 1% (b/v) dan disimpan pada suhu 4°C sebagai fraksi endapan 30% (FE-30%). Hal yang sama dilakukan dengan konsentrasi akhir amonium sulfat 45 dan 60%, sehingga diperoleh fraksi endapan 15, 30, 45, dan 60% (FE-15%, FE-30%, FE-45%, dan FE-60%). Fraksi-fraksi endapan tersebut kemudian didialisis. Fraksi-fraksi hasil dialisis yang diperoleh diuji aktivitas dan kadar

proteinnya. Fraksi hasil dialisis yang memiliki aktivitas tertinggi ditentukan pH optimum, suhu optimum, nilai V_{maks} dan K_M , dan pengaruh ion-ion logam (Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) dan EDTA terhadap aktivitas enzim.

Uji aktivitas protease (Sunarto et al, 1999). Sebanyak 0,5 mL substrat kasein (0,5% b/v) dalam bufer Tris HCl pH 8,0 dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 35°C. Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan ke dalam substrat dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 ml larutan TCA 3,5% dalam keadaan dingin. Campuran uji dibiarkan mengendap selama 30 menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 g pada suhu 4°C selama 10 menit. Peptida terlarut dalam supernatan hasil hidrolisis dibaca secara spektrometri pada $\lambda = 276$ nm. Tabung reaksi kontrol, dilakukan penambahan larutan TCA selanjutnya larutan enzimnya. Larutan tirosina (0-100 μ g/ml) digunakan sebagai standar untuk pengukuran aktivitas proteolitik. Aktivitas protease (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 μ g tirosina (ekuivalen)/menit/ml larutan enzim dari substrat kasein pada kondisi pengujian tersebut.

Penentuan kadar protein (Lowry 1964 dalam Bollag et al, 1996). Sebanyak 0,5 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan 5 ml pereaksi C. Larutan-larutan tersebut dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambah Follin Ciocalteu sebanyak 0,5 ml, dikocok dan dibiarkan selama 30 menit. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang 750 nm. Kontrol dibuat dengan campuran yang sama pada tabung sampel, tetapi larutan sampel diganti dengan akuades. Standar protein dibuat dengan memasukkan 0,5 ml kasein *Hamerstein* dalam bufer Tris-HCl ke dalam 6 buah tabung reaksi dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 mg per ml, selanjutnya perlakuan sama seperti sampel.

Penetapan pH Protease. Prosedur kerja penetapan pH optimum enzim sama dengan seperti pada uji aktivitas protease, tetapi dengan variasi pH. Variasi pH yang dilakukan adalah 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10. Bufer pH yang digunakan adalah bufer natrium asetat untuk pH 4-5, bufer Na-fosfat untuk pH 6-7, bufer Tris-HCl untuk pH 8-9, dan bufer borax NaOH untuk pH 10.

Penetapan suhu optimum. Prosedur kerja penentuan suhu optimum enzim sama seperti uji aktivitas protease dengan variasi suhu 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; dan 65°C, inkubasi dilakukan bergantian.

Penentuan V_{maks} dan K_M (Kamelia et al, 2005). Penentuan V_{maks} dan K_M dilakukan dengan menguji aktivitas protease pada kondisi pH dan suhu optimum dengan variasi konsentrasi substrat kasein yaitu 0,5; 1; 1,5; 2,0 dan 2,5%. Metode uji aktivitas protease yang digunakan sama seperti sebelumnya. Data aktivitas (V) terhadap konsentrasi (S) yang diperoleh kemudian dialurkan pada persamaan Lineweaver-Burk. Nilai V_{maks} dan K_M diperoleh dari nilai $1/V_{maks}$ dan $-1/K_M$.

Penentuan pengaruh EDTA dan berbagai ion logam terhadap aktivitas protease. Penentuan pengaruh penambahan EDTA dan ion logam (Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) ditentukan dengan menambahkan EDTA dan ion-ion logam masing-masing dengan konsentrasi 10^{-2} M sebanyak 0,06 ml ke dalam larutan sampel sehingga konsentrasi akhir larutan pada saat uji aktivitas dilakukan adalah 10^{-3} M. Sebagai pembanding aktivitas dilakukan uji pada sampel enzim tanpa penambahan EDTA dan ion-ion logam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri dari limbah cair tahu. Sampel limbah cair tahu diperoleh di sekitar industri tahu Desa Kalisari Cilongok Banyumas. Kondisi sampel yang diambil bersuhu 28°C dengan pH 4. Sampel yang ditumbuhkan pada medium SMA tumbuh beberapa koloni seperti terlihat dalam Tabel 1. Bakteri yang ditumbuhkan untuk produksi protease adalah isolat 4, karena memiliki kesuburan yang tinggi dan terbentuk zona jernih. Isolat 4 selanjutnya dilakukan identifikasi. Hasil identifikasi isolat 4 dapat dilihat pada Tabel 2. Isolat 4 ini diduga teridentifikasi sebagai bakteri *Staphylococcus* sp. (Drapeau et al, 1972), mengisolasi

Tabel 1. Isolat dari limbah cair tahu

Isolat	Bentuk Koloni	Warna Koloni	Zona Jernih pada Medium SMA	Tingkat Kesuburan
1	Bulat	Putih	-	+
2	Berserabut	Putih	+	+++
3	Bulat	Putih	-	+++
4	Berserabut	Krem	+	+++
5	Bulat	Krem	-	+
6	Bulat	Krem	-	++
7	Bulat Kecil	Putih	-	+

Tabel 2. Hasil identifikasi isolat 4

Marfologi Koloni	Bentuk Sel	Gram	Uji Katalase	Uji Oksidase	Uji Reduksi Nitrat	Pendugaan Jenis MO
Bentuk Bulat, tepi tidak rata, warna putih kekuningan, permukaan kusam; rata, koloni kecil ($d \pm 0,5 - 1$ mm), tumbuh di MSA (<i>Imannitol Salt Agar</i>)	Coccus	(+)	(+)	(-)	(+)	<i>Staphylococcus sp.</i>

Tabel 3. Hasil pemurnian protease dengan fraksinasi amonium sulfat

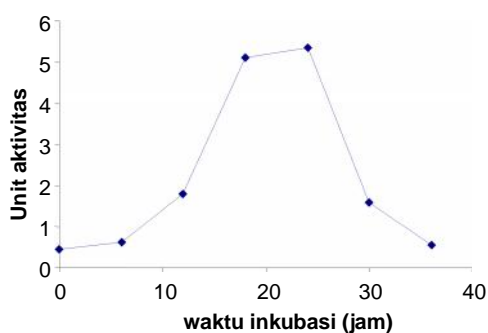
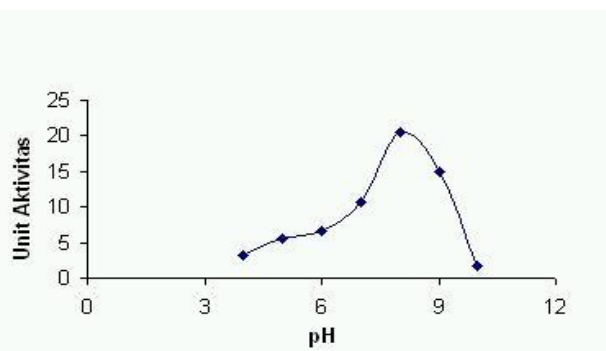
Tahap pemurnian	Volume sample (mL)	Protein (mg/mL)	Total protein (mg)	Aktivitas (U/ mL)	Total aktivitas (U)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian (%)
Ekstrak kasar	300,00	3,34	1002,90	11,85	3555,60	3,55	1,00
FS-15%	15,00	1,04	15,57	5,93	88,89	5,71	1,61
FS-30%	15,00	0,90	13,44	13,55	203,18	15,11	4,26
FS-45%	14,50	0,44	6,39	18,62	270,05	42,24	11,91
FS-60%	14,50	0,58	8,45	39,79	576,93	68,22	19,24

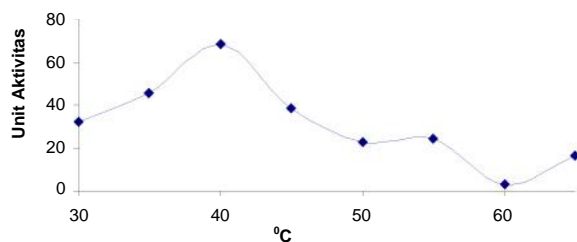
protease ekstraseluler dari *Staphylococcus aureus*, mendapatkan hasil protease yang aktif pada pH 4,0 sampai 7,8 dan tidak dihambat oleh EDTA. Isolat 4 (*Staphylococcus sp*) ditentukan dahulu waktu produksi optimumnya. Hasil penentuan waktu produksi optimum terlihat dalam Gambar 1 yang menunjukkan bahwa waktu produksi optimum protease dari *Staphylococcus sp.* adalah 24 jam dengan aktivitas sebesar 5,36 Unit. Produksi enzim selanjutnya dilakukan pada waktu produksi optimum.

Fraksinasi protease ekstraseluler dengan amonium sulfat. Fraksinasi dengan amonium sulfat merupakan salah satu cara pemurnian protein melalui proses pengendapan garam. Penambahan garam amonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadinya kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out*. Fraksinasi amonium sulfat

dilakukan dengan konsentrasi 15, 30, 45, dan 60% jenuh. Hasil pemurnian protease dari *Staphylococcus sp* terlihat dalam Tabel 3. Tabel tersebut menunjukkan bahwa fraksi 60% jenuh mempunyai aktivitas tertinggi, dengan aktivitas spesifik 68,22 U/mg dan tingkat kemurnian 19,24 kali ekstrak kasarnya, sehingga fraksi ini dikarakterisasi lebih lanjut meliputi penentuan pH dan suhu optimum, nilai K_M dan V_{maks} , pengaruh penambahan EDTA dan ion logam terhadap aktivitas protease.

Penentuan pH dan suhu optimum. Hasil penentuan pH optimum terlihat dalam Gambar 2. Pada grafik tersebut terlihat pH optimum protease dari *Staphylococcus sp.* pada pH 8,0. Pada pH 9, aktivitasnya masih 71,28% dibandingkan pH 8,0, sedangkan pada pH 7,0 aktivitasnya 52,54%. Dengan demikian jangkauan aktivitas 60% dibandingkan kondisi optimum berada pada kisaran pH 7,5–9,5. (Sookkheo

Gambar 1. Penentuan waktu produksi protease optimum dari *Staphylococcus sp.*Gambar 2. Penentuan pH optimum aktivitas protease dari *Staphylococcus sp.*



Gambar 3. Penentuan suhu optimum protease dari *Staphylococcus* sp

stearothermophilus TLS33, dan mendapatkan protease S yang aktif pada jangkauan pH 6-10. (Nascimento & Maire 2004), meneliti protease dari *Bacillus* sp dan mendapatkan pH optimumnya 8,0. Suhu optimum protease dari *Staphylococcus* sp ditentukan dalam jangkauan suhu 30°C sampai 65°C. Hasil penentuan suhu optimum ini terlihat dalam Gambar 3. Aktivitas protease dari *Staphylococcus* sp meningkat pada suhu 30°C sampai 40°C, kemudian menurun. Suhu optimum protease ini pada 40°C.

Penentuan V_{maks} dan K_M . Pengaruh penambahan substrat terhadap aktivitas enzim ditunjukkan dengan bertambahnya laju reaksi sebanding dengan penambahan konsentrasi substrat hingga pada suatu saat konsentrasi substrat tidak lagi berpengaruh terhadap laju reaksi, disaat itu laju reaksi mencapai nilai maksimum (V_{maks}). Konstanta Michaelis-Menten (K_M) ditentukan untuk mengetahui afinitas enzim terhadap substratnya. Enzim yang berbeda akan memiliki nilai K_M yang berbeda pula. Nilai K_M dipandang tinggi jika konsentrasi substrat untuk mencapai setengah kecepatan maksimumnya juga tinggi. Hal ini berarti pula bahwa enzim tersebut tidak mempunyai afinitas terhadap substratnya (Kusnawidjaja 1987). Hasil penentuan V_{maks} dan K_M terlihat dalam Gambar 4. Pada

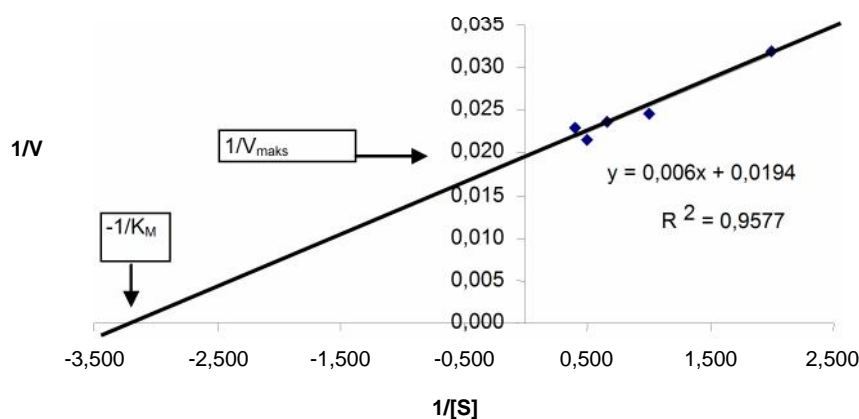
Tabel 4. Pengaruh EDTA dan ion logam pada aktivitas protease dari *Staphylococcus* sp.

Jenis	Unit Aktivitas	% Aktivitas
Tanpa Penambahan	85,470	100,00
EDTA	3,761	4,40
Cu ²⁺	2,393	2,80
Co ²⁺	84,103	98,40
Mg ²⁺	90,598	106,00
Zn ²⁺	41,368	48,40

kurva tersebut, dari persamaan garisnya dapat diketahui nilai $-1/K_M$ sebesar -3,23 dan $1/V_{maks}$ sebesar 0,0194, sehingga nilai untuk K_M sebesar 0,31% dan nilai V_{maks} sebesar 51,55 U/ml.

Pengaruh EDTA dan berbagai ion logam.

Protease logam merupakan protease yang aktivitasnya dipengaruhi oleh keberadaan ion logam pada sisi katalitiknya. Aktivitas protease logam akan meningkat dengan penambahan ion logam divalen tertentu (Ogawa *et al*, 1979). Hasil penelitian pengaruh penambahan EDTA dan berbagai logam terlihat dalam Tabel 4. Data pada tabel tersebut menunjukkan aktivitas protease menurun sebesar 4,4% dengan adanya EDTA. Hal ini menunjukkan bahwa protease dari *Staphylococcus* sp. merupakan protease logam. Hasil penelitian juga menunjukkan adanya peningkatan aktivitas protease sebesar 106% dengan adanya ion logam Mg²⁺, sehingga ion Mg²⁺ berfungsi sebagai aktivator protease dari *Staphylococcus* sp. Sedangkan ion logam yang lain (Zn²⁺, Co²⁺ dan Cu²⁺) menurunkan aktivitasnya. Ion logam berperan dalam aktivitas katalitik protease dan stabilitas konformasi protease (Ogawa *et al*, 1979). Protease merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis protein. Pada reaksi hidrolisis protein ion logam yang berperan sebagai aktivator membentuk



Gambar 4. Penentuan K_M dan V_{maks} protease dari *Staphylococcus* sp.

ikatan koordinasi dengan residu asam amino dari protease dan bersifat sebagai akseptor elektron (asam Lewis) sehingga mampu berinteraksi dengan basa yaitu gugus OH dari molekul air.

KESIMPULAN

Salah satu mikroorganisme dari limbah cair tahu yang dapat menghasilkan protease ekstraseluler diduga adalah *Staphylococcus* sp. Aktivitas spesifik tertinggi pemurnian protease ini diperoleh pada fraksi amonium sulfat 60% (FS-60%) sebesar 68,22 U/mg protein dengan tingkat kemurnian 19,24 kali ekstrak enzim kasar. Protease yang dihasilkan mempunyai pH optimum 8,0, suhu optimum 40°C, Konstanta Michaelis-Menten (K_M) 0,3% dan kecepatan maksimum (V_{maks}) 51,55 U/ml. Aktivitas protease ini dihambat oleh EDTA dan beberapa ion logam seperti Cu^{2+} , Co^{2+} dan Zn^{2+} , sedangkan ion yang meningkatkan aktivitas protease ini adalah Mg^{2+} .

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Program Studi Kimia Jurusan MIPA Fakultas Sains dan Teknik UNSOED yang telah menyediakan dana untuk terlaksananya penelitian ini, dan kepada Ika Hariyanti yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., & Edelstein, S. I. 1996. *Protein Methods 2nd Ed.* New York: John Willey and Sons.
 Drapeau, G.R., Boily, Y., & Houmard, J. 1972. Purification and properties of extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*. **247(20)**: 6720-6726.

Kamelia, R., Muliawati, S., & Dessy, N. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraselular termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. Seminar Nasional MIPA UI. Jakarta.
 Kusnawidjaya, K. 1987. *Biokimia*. Bandung: Alumi.
 Michael, H., Cardone, Natalie R., Henning R., Stennicke., Guy, S., Salvesen., Thomas, F. F., Eric S., Steven F., and John C. R. 1998. Regulation cell death. *Reports. Science*. **282**.
 Nascimento, W.C.A. & Meire, L.L.M. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* Sp. *Brazilian. Journal of Microbiology*. **35**:91-96
 Nunes, A.S. & Martins, M.L.L. 2001. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol.* **32**: 271-275.
 Ogawa S., Shiro., Morishima, 1979. *Biochem. Biophys. Res. Common.* **90**. 674-8.
 Ohta, Y., Ogura Y., & Wada A. 1966. Thermostable protease from thermophilic bacterial, I. Thermostability, physical properties, and amino acids composition. *Journal of Biological Chemistry*. **241**: 5919-5925.
 Pastor, M.D., Lorda, G.S., & Balatti, A. 2001. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Braz. J. Microbiol.* **32**: 1-8.
 Singh, J., Batra, N., & Sobti, C.R. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Proc. Biochem.* **36**: 781-785.
 Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., & Chen, S.T. 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Prot. Exp. Pur.* **20**: 142-151.
 Sulistyanyngtyas, E. 2006. Pengaruh penambahan ammonium sulfat dan waktu penundaan bahan baku limbah cair terhadap kualitas Nata De Soya. <http://library.gunadarma.ac.id> (21 Mei 2006).
 Sunarto, Bambang, S. & Widya, A. 1999. Isolasi dan purifikasi enzim protease *Bacillus* sp local. *Majalah Ilmiah UNSOED*. **4**: 23-31.
 Triyono, S. & Hasanudin, U. 1998. Pengurangan beban pencemaran air limbah industri tahu melalui proses pengurangan kadar minyak kedelai. Laporan penelitian. Lampung: Faperta Universitas Lampung
 Ward, O.P. 1985. Proteolytic enzymes. Di dalam M. Moo-Young (Editor). *Comprehensive Biotechnol.* **3**: 789-818.
 Yun. 2006. Dari limbah keluarlah enzim. <http://www.kompas.com> (14 Mei 2006)
 Zeikus, J.G., Vieille, C., & Savchenko, A. 1998. Thermozyms: Biotechnology and structure-function relationship. *Extremophiles*. **1**: 2-13.