

Optimasi Produksi Enzim Protease dari *Candida* G3.2

Nikita D. Prasetyo dan Nur H. Alami

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: hidayatulalami@bio.its.ac.id

Abstrak—Protease (EC 3.4) merupakan salah satu kelas enzim yang penting dalam aplikasi bioteknologi dan industri. Enzim protease banyak dihasilkan dari mikroorganisme, salah satunya adalah *marine yeast*. Produksi enzim protease dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti masa inkubasi, suhu dan pH. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui masa inkubasi serta suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease dari *Candida* G3.2. Optimasi produksi protease diawali dengan optimasi masa inkubasi dilanjutkan dengan optimasi suhu dan pH. Variasi masa inkubasi yang digunakan adalah 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 dan 168 jam. Variasi suhu yang digunakan adalah suhu ruang, 45°C dan 55°C. Sedangkan variasi pH yang digunakan adalah 4,5, 7 dan 9. Pengujian optimasi produksi protease didasarkan pada aktivitas enzim yang dihasilkan dengan tirosin sebagai produk yang diukur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Candida* G3.2 mampu memproduksi enzim protease secara optimal pada masa inkubasi 72 jam dengan nilai aktivitas enzim sebesar 321,5 U/mL serta pada suhu 55°C dan pH 9 dengan nilai aktivitas enzim 135,25 U/mL.

Kata Kunci—aktivitas enzim, *Candida* G3.2, protease, tirosin

I. PENDAHULUAN

DEWASA ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri komersial. Total penjualan pada industri enzim diperkirakan akan mencapai angka \$6 milyar di tahun 2016 [1]. Enzim protease menempati sekitar 60% dari total penjualan enzim [2]. Enzim ini banyak digunakan dalam bidang industri deterjen, pangan, kulit, farmasi dan industri kimia lainnya [3].

Protease (EC 3.4) merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida pada protein [4]. Produksi enzim protease paling banyak dihasilkan oleh mikroorganisme [5]. Mikroorganisme sebagai sumber enzim lebih menguntungkan karena mudah dikultivasi dalam skala besar dalam waktu yang relatif singkat, kecepatan pertumbuhan relatif lebih cepat dan enzim yang dihasilkan lebih stabil. Selain itu mikroorganisme mudah direkayasa secara genetika untuk mendapatkan produksi enzim yang optimum [6]. Salah satu mikroorganisme yang mampu memproduksi enzim protease adalah *marine yeast*. Namun hanya sedikit publikasi mengenai produksi enzim protease oleh *marine yeast* antara lain *Aureobasidium pullulans* strain 10 [6], *Metschnikowia reukaufii* W6b [7] dan *Rhodotorula mucilaginosa* L7 [8]

Produksi protease banyak dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pH, suhu dan masa inkubasi [9]). Mayoritas proses industri membutuhkan enzim yang mampu bertahan pada kondisi yang ekstrem. Sehingga sangat penting untuk enzim yang digunakan memiliki kondisi yang optimal pada rentang suhu dan pH yang luas [10]. Masa inkubasi yang sesuai akan menghasilkan produksi protease yang maksimum ditandai dengan tingginya aktivitas enzim yang dihasilkan [11].

Pada penelitian sebelumnya [12], ditemukan bahwa *marine yeast Candida* G3.2 yang diisolasi dari Kawasan Rhizosfer Mangrove Gunung Anyar, Surabaya memiliki potensi secara kualitatif dan kuantitatif dalam mendegradasi protein. Sehingga dapat dikatakan bahwa isolat *Candida* G3.2 mampu memproduksi enzim protease. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengoptimalkan enzim protease yang diproduksi oleh isolat *Candida* G3.2 untuk memenuhi kebutuhan protease yang semakin meningkat. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui masa inkubasi serta suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease dari *Candida* G3.2.

II. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Mei 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).

B. Subkultur Isolat *Candida* G3.2

Isolat *Candida* G3.2 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS disubkultur pada medium YMEA miring. Isolat *marine yeast* diinokulasi dengan metode gores dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang.

C. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat *Candida* G3.2

Kurva pertumbuhan diamati dengan cara mengukur kepadatan sel *yeast* menggunakan *Optical Density* (OD). Isolat G3.2 dari YMEA miring disuspensikan dalam air fisiologis steril 0,85% hingga didapatkan nilai OD 0,5. Kultur dari suspensi *marine yeast* dimasukkan ke dalam medium YMB kemudian diinkubasi dalam *rotary shaker* pada suhu ruang.

Pengukuran OD dilakukan tiap 12 jam menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Setelah diketahui fase pertumbuhannya, maka umur starter (μ) dapat ditentukan yaitu pada fase eksponensial [5].

D. Pembuatan Medium Produksi Enzim Protease

Enzim protease diproduksi dalam medium *Czapek Dox Broth* yang mengandung 30 gr sukrosa, 10 gr kasein, 3 gr NaNO_3 , 1 gr KH_2PO_4 , 0,5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 gr KCl, 0,01 gr FeSO_4 dan 100 mg/L kloramfenikol yang dilarutkan dalam 1 liter akuades. Medium disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

E. Optimasi Produksi Enzim Protease

1) Persiapan Medium Prekultur

Medium prekultur yang digunakan adalah medium produksi protease. Isolat *Candida* G3.2 dari YMEA miring disuspensikan dalam air fisiologis steril hingga didapatkan nilai OD 0,5 pada panjang gelombang 600 nm. Kultur dari suspensi *yeast* dimasukkan ke dalam medium produksi protease steril. Kultur kemudian diinkubasi selama μ jam dalam *rotary shaker* pada suhu ruang.

2) Optimasi Masa Inkubasi

Kultur *yeast* dari medium prekultur diinokulasikan sebanyak 10 mL ke dalam 90 mL medium produksi enzim protease. Medium produksi kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, 120 jam, 144 jam dan 168 jam dalam *rotary shaker* pada suhu ruang.

3) Optimasi pH dan Suhu

Optimasi pH dan suhu terhadap produksi enzim protease dari *Candida* G3.2 diuji dengan cara mengkombinasikan kedua faktor tersebut. Variasi pH awal medium yang ditentukan adalah 4,5, 7 dan 9. Sedangkan variasi suhu inkubasi yang digunakan yaitu suhu ruang, 45°C dan 55°C .

Kultur *yeast* dari medium prekultur diinokulasikan sebanyak 10 mL ke dalam 90 mL medium produksi enzim protease. Medium produksi kemudian diinkubasi sesuai dengan variasi kombinasi pH dan suhu yang telah ditentukan pada *thermo shaker* dalam waktu inkubasi optimal yang didapatkan dari tahapan sebelumnya.

F. Pembuatan Kurva Standar Tirosin

Kurva standar tirosin dibuat dari larutan stok tirosin dengan konsentrasi 0,3 mg/mL atau setara dengan 1650 μM . Selanjutnya, larutan stok tirosin diencerkan menjadi beberapa variasi konsentrasi yaitu 100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM dan 600 μM . Variasi konsentrasi dibuat dengan cara mengambil larutan standar tirosin 0,3 mg/mL sebanyak 0,6 mL; 1,2 mL; 1,8 mL; 2,4 mL; 3 mL dan 3,6 mL lalu diencerkan dengan aquades sampai 10 mL. Tiap konsentrasi tersebut diambil 0,2 mL kemudian ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 0,5M dan diinkubasi selama 10 menit. Larutan kemudian ditambahkan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu dan diinkubasi

selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan regresi liniernya.

G. Produksi Enzim Protease

Kultur produksi disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak crude enzim yang selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas protease.

H. Uji Aktivitas Enzim Protease

Crude enzim sebanyak 0,25 mL ditambahkan dengan 0,25 mL buffer fosfat pH 7 dan dipreinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . Larutan selanjutnya ditambahkan dengan 0,25 mL substrat (2% kasein dalam buffer fosfat pH 7) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,5 mL reagen TCA 3% (Trichloro Acetic Acid). Larutan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 0,2 mL lalu ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 0,5M dan diinkubasi selama 10 menit. Larutan kemudian ditambahkan dengan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Pengukuran absorbansi larutan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm. Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk melepaskan 1 μmol tirosin dari substrat kasein per menit pada kondisi uji yang ditentukan.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menginterpolarisasikan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan linear kurva standar tirosin kemudian dihitung dengan rumus berikut.

$$SA = \frac{x \cdot v}{t \cdot s}$$

Keterangan:

SA : aktivitas enzim (unit/mL)
 x : konsentrasi tirosin (μmol)
 V : volume total reaksi (mL)
 t : waktu reaksi (menit)
 s : volume enzim (mL)

I. Rancangan Penelitian

Desain penelitian menggunakan rancangan faktorial yang terdiri dari dua faktor yang saling dikombinasikan yaitu suhu dan pH. Data aktivitas enzim dari optimasi suhu dan pH dianalisis secara statistik menggunakan Anova Two-Way. Sedangkan data aktivitas enzim dari optimasi masa inkubasi dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

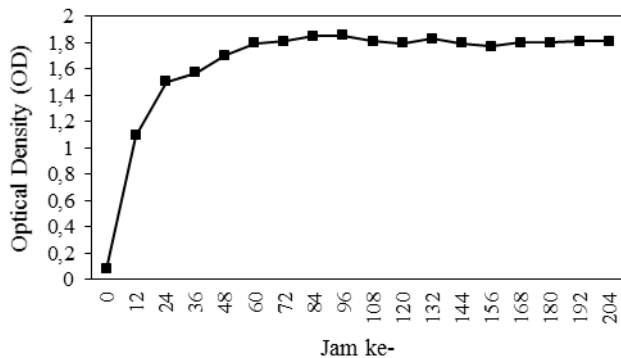
A. Kurva Pertumbuhan *Candida* G3.2

Kurva pertumbuhan *Candida* G3.2 diperlukan untuk menentukan umur starter terbaik yang digunakan untuk

produksi enzim protease. Gambar 1 menunjukkan profil kurva pertumbuhan *Candida* G3.2 tidak tampak adanya fase lag. Hal ini disebabkan pengukuran OD dilakukan setiap 12 jam. Fase lag merupakan fase adaptasi dimana sel mikroba menyesuaikan diri terhadap kondisi lingkungan yang baru [13]. Pada fase ini, sel aktif secara biokimia tetapi tidak membelah [14].

Fase eksponensial *Candida* G3.2 terjadi pada jam ke-0 sampai ke-60. Ketersediaan nutrisi yang cukup memungkinkan sel untuk melakukan pembelahan sehingga jumlah sel meningkat secara cepat [14]. Selain itu mikroba juga banyak memproduksi metabolit primer pada fase ini [15], salah satunya adalah enzim protease. Fase eksponensial merupakan fase paling sesuai untuk starter dikarenakan aktivitas metabolisme berlangsung secara aktif dan optimum serta dapat mensintesis bahan dengan cepat dan dalam jumlah konstan [16].

Fase stasioner terjadi pada jam ke-60 sampai ke-204. Fase ini menunjukkan keadaan jumlah sel yang hidup relatif seimbang dengan jumlah sel yang mati. Metabolisme *yeast* semakin melambat disebabkan oleh nutrisi yang disediakan dalam medium terbatas. Selain itu adanya akumulasi produk buangan dari hasil metabolisme yang bersifat toksik bagi sel dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel tersebut [17]. Oleh karena itu, pertumbuhan sel pada fase ini cenderung mendatar pada kurva.



Gambar 1. Profil kurva pertumbuhan *Candida* G3.2

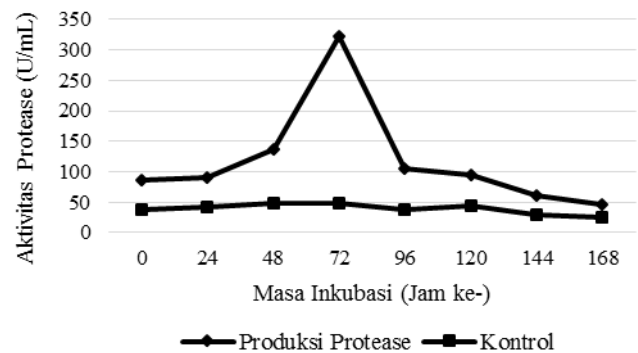
Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 1 dapat diketahui umur kultur starter yang digunakan untuk produksi enzim protease adalah 30 jam setelah inokulasi dimana merupakan fase eksponensial.

B. Optimasi Masa Inkubasi

Hasil pengujian pada Gambar 2 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas protease dari jam ke-0 sebesar 86,125 U/mL hingga mencapai aktivitas protease optimal pada jam ke-72 sebesar 321,5 U/mL. Meningkatnya nilai aktivitas protease diduga disebabkan oleh tingginya aktivitas metabolisme sel *yeast* dalam melakukan pembelahan sel dan sintesis enzim. Rujukan [18] menyatakan bahwa sekresi enzim bergantung pada jumlah sel dan fase pertumbuhan mikroorganisme spesifik. Enzim ekstraseluler disintesis oleh mikroorganisme selama fase eksponensial sampai fase

stasioner mengikuti pola kurva pertumbuhannya. Aktivitas enzim tertinggi dicapai seiring berakhirnya fase eksponensial dalam kurva pertumbuhan [19].

Setelah 72 jam terjadi penurunan aktivitas protease secara bertahap sampai jam ke 168 hingga mencapai nilai aktivitas sebesar 46,125 U/mL. Penurunan aktivitas protease tersebut dapat disebabkan karena tidak tersedia nutrisi dan substrat yang cukup dalam medium produksi [20], terjadinya autolisis sel akibat adanya akumulasi berbagai enzim di dalam medium [21] dan ketidakstabilan crude enzim akibat terlalu lama dibiarkan dalam medium produksi [22]. Sehingga dapat diketahui bahwa jam ke-72 merupakan masa inkubasi optimum untuk ekstraksi enzim protease.



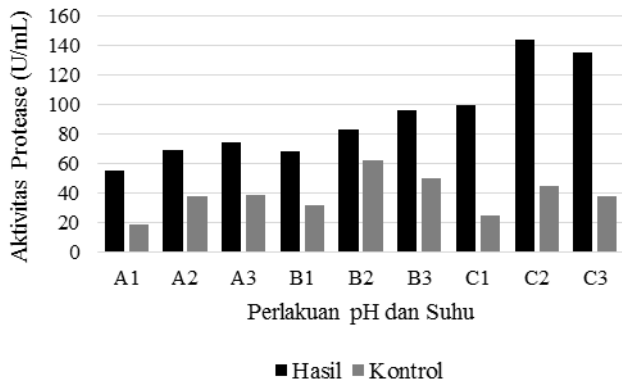
Gambar 2. Grafik pengaruh masa inkubasi terhadap produksi enzim protease dari *Candida* G3.2

C. Optimasi Suhu dan pH

Hasil pengujian secara statistik menggunakan ANOVA Two-Way menyatakan bahwa terdapat pengaruh antara suhu dengan aktivitas protease dengan nilai P-value 0,000 (P-value < 0,05) dan pH dengan aktivitas protease dengan nilai P-value 0,039 (P-value < 0,05). Namun tidak terdapat pengaruh interaksi antara suhu dan pH terhadap aktivitas protease dengan nilai P-value 0,691 (P-value > 0,05).

Uji lanjut pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan uji Tukey tanpa memperhatikan variabel pH, diperoleh hasil bahwa suhu 55°C memberikan hasil aktivitas tertinggi dan berbeda signifikan bila dibandingkan dengan suhu ruang dan 45°C. Sehingga pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa suhu 55°C merupakan suhu optimum untuk produksi protease.

Pada Gambar 3 ditunjukkan bahwa peningkatan suhu berbanding lurus dengan nilai aktivitas protease. Suhu dapat meregulasi sintesis dan sekresi protease ekstraseluler [23]. Pada penelitian ini, kenaikan suhu menginduksi sekresi protease yang berbanding lurus dengan nilai aktivitas protease. Suhu mampu meregulasi sintesis enzim pada tahap transkripsi mRNA dan dimungkinkan pula pada tahap [24]. Untuk enzim ekstraseluler, suhu dapat mempengaruhi sekresi enzim dimungkinkan dengan mengubah sifat fisik dari membran selnya [25].



Gambar 3. Grafik pengaruh suhu dan pH terhadap produksi enzim protease dari *Candida* G3.2

Keterangan gambar: (A1= suhu ruang+pH 4,5; A2= suhu ruang+pH 7; A3= suhu ruang+pH 9; B1= suhu 45°C+pH 4,5; B2= suhu 45°C+pH 7; B3= suhu 45°C+pH 9; C1= suhu 55°C+pH 4,5; C2= suhu 55°C+pH 7; C3=suhu 55°C+pH 9)

Hasil uji Tukey untuk pengaruh pH terhadap produksi protease tanpa memperhatikan variabel suhu, diperoleh hasil bahwa pH 9 memberikan hasil aktivitas tertinggi dan berbeda signifikan dengan pH 4,5 namun tidak berbeda signifikan dengan pH 7. Sehingga pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa pH 9 merupakan pH optimum untuk produksi protease. Hal ini dimungkinkan berkaitan dengan habitat dari *Candida* G3.2 yang diisolasi dari kawasan mangrove Gunung Anyar, Surabaya. Pada umumnya, perairan di kawasan mangrove cenderung basa [26].

Pada Gambar 4.3 ditunjukkan bahwa semakin meningkat pH medium maka aktivitas protease juga relatif meningkat. pH medium kultur sangat mempengaruhi reaksi enzimatik serta transportasi senyawa yang melewati membran sel dimana pH berkaitan terhadap konsentrasi ion hidrogen yang terdapat pada medium [27]. pH diketahui mampu mempengaruhi sekresi protease dalam medium produksi. pH medium mempengaruhi ketersediaan ion metabolik tertentu dan permeabilitas membran sel mikroorganisme dimana keduanya akan mendukung pertumbuhan sel dan produksi enzim [28].

IV. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah *Candida* G3.2 mampu memproduksi enzim protease secara optimal pada masa inkubasi 72 jam dengan nilai aktivitas sebesar 321,5 U/mL. Kombinasi suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease adalah pada suhu 55°C dan pH 9 dengan nilai aktivitas sebesar 135,25 U/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si selaku pembimbing, Ir. Sri Nurhatika, MP dan Wirdatul Muslihatin, S.Si., M.Si selaku tim penguji.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada ayah dan ibu atas segala doa restu dan kasih sayangnya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Gupta, V., March, R.L., dan Sreenivasaprasad, S. *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*. United Kingdom: John Wiley & Sons (2015).
- [2] Oyeleke, S.B., Egwim, E.C., and Auta, S.H. "Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* Strains for Extracellular Protease Enzyme Production". *Journal of Microbiology and Antimicrobials* Vol. 2, No. 7 (2010) 83-87.
- [3] Li, Q., Yi, L., Marek, P dan Iverson, B.L. "Commercial Proteases: Present and Future". *FEBS Letters* Vol. 587 (2013) 1155-1163.
- [4] Ayaz, N.O. "Formation of Proteases from Newly Isolated Strain Isolated from Saudi Arabia". *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 2, No. 8 (2012) 190-193.
- [5] Jisha, V.N., Smitha, R.B., dan Pradeep, S. "Versatility of Microbial Proteases". *Advances in Enzyme Research* Vol. 1 (2013) 39-51.
- [6] Chi, Z.C., Ma, P., dan Wang, H.F. "Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Alkaline Protease Production by the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans*". *Bioresource Technology* Vol. 98 (2007) 534-538.
- [7] Li, J., Peng, Y., Wang, X., dan Chi, Z. "Optimum Production and Characterization of an Acid Protease from Marine Yeast *Metschnikowia reukauffii* W6b". *Journal of Ocean University of China* Vol. 9, No. 4 (2010) 359-364.
- [8] Lario, L.D., Chaud, L., Almeida, M.G., Sette, L.D., dan Pessoa, A. "Production, Purification, and Characterization of an Extracellular Acid Protease from the Marine Antarctic Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7". *Fungal Biology* Vol. 119 (2015) 1129-1136.
- [9] Beg, Q.K., Sahai, V. dan Gupta, R. "Statistical Media Optimization and Alkaline Protease Production from *Bacillus mojavensis* in a Bioreactor". *Process Biochemistry* Vol. 39 (2003) 203.
- [10] Bizuye, A., Sago, A., Admasu, G., Getachew, H., Kassa, P., dan Amsaya, M. "Isolation, Optimization and Characterization of Protease Producing Bacteria from Soil and Water in Gondar town, North West Ethiopia". *International Journal of Bacteriology, Virology and Immunology* Vol. 1, No. 3 (2014) 020-024.
- [11] Yuniati, R., Nugroho, T.T., dan Puspita, F. "Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau". *JOM FMIPA* Vol.1, No.2 (2015).
- [12] Alami, N.H dan Shovitri, M. "Studi Lanjut Marine Yeast sebagai Biofertilizer Komersial". *Laporan Akhir Penelitian Pemula. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember*. Surabaya (2015).
- [13] Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, Baranyi, J., Peck, M.W., R.P Hinton, J.C. "Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation". *Journal of Bacteriology* Vol. 194, No. 3 (2011) 686-701.
- [14] Patil, U., Chaudhari, A.B., Kulkarni, J.S. dan Chincholkar, S.B. *Foundations in Microbiology*. India: Rachana Enterprises (2008).
- [15] Sanchez, S. dan Demain, A.L. "Metabolic Regulation and Overproduction of Primary Metabolites". *Microbial Biotechnology* Vol. 1, No. 4 (2008) 283-319
- [16] Purkan., Azizah, B., Baktir, A. dan Sumarsih, S. "Eksplorasi Bakteri Kitinolitik Dari Sampah Organik: Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase". *Jurnal Ilmiah Kimia Molekul* Vol. 9, No. 2 (2014) 128-135.
- [17] Pepper, I.L., Gerba, C.P. dan Gentry, T.J. *Environmental Biology Third Edition*. USA: Elsevier (2015)
- [18] Das, A., Paul, T., Halder, S.K., Maity, C., Mohapatra, P.K.D., Pati, B.R. dan Mondal, K.C. "Study on Regulation of Growth and Biosynthesis of Cellulolytic Enzymes from Newly Isolated *Aspergillus fumigatus* ABK9". *Journal of Microbiology* Vol 62, No.1 (2013) 31-43.
- [19] Ire, F.S., Okolo, B.N., Moneke, A.N. dan Odibo, F.J. "Influence of Cultivation Conditions on the Production of a Protease from *Aspergillus carbonarius* Using Submerged Fermentation". *African Journal of Food Science* Vol. 5, No.6 (2011) 353-365.

- [20] Srividya, S. dan Mala, M. 2009. "Influence of Process Parameters on the Production of Detergent Compatible Alkaline Protease By a Newly Isolated *Bacillus* sp. Y". *Turkish Journal of Biology* Vol. 35, No. 2 (2009) 177-182.
- [21] Olajuyigbe, F.M. "Optimized Production and Properties of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* SHS-04 Grown on Groundnut (*Arachis hypogaea*) Meal". *Advances in Enzyme Research* Vol. 1, No. 4 (2013) 112-120.
- [22] Rabelo, M.C., Fontes, C.M.L. dan Rodrigues, S. "Stability Study of Crude Dextranase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742". *Indian Journal of Microbiology* Vol. 51, No. 2 (2011) 164-170.
- [23] Ray, M.K., Devi, K.U., Kumar, G.S. dan Shivaji, S. "Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*". *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 58, No. 6 (1992) 1918-1923.
- [24] Votruba, J., Pazlarova, J., Dvorakova, M., Vachora, L., Strnadova, M., Kucerova, H., Vinter, V., Zourabian, R., Chaloupka, J. "External Factors Involved in the Regulation of Synthesis of an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium*: Effect of Temperature". *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 35 (1991) 352-357.
- [25] Rahman, R.N., Geok, L.P., Basri, M. dan Saleh, A.B. "Physical Factors Affecting the Production of Organic Solvent-Tolerant Protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K". *Bioresource Technology* Vol. 96 (2004) 429-436.
- [26] Rahman, M.M., Rahman, M.T., Rahaman, M.S., Rahman, F., Ahmad, J.U., Shakera, B. dan Halim, M.A. "Water Quality of the World's Largest Mangrove Forest". *Canadian Chemical Transactions* Vol. 1, No. 2 (2013) 141-156.
- [27] Rupali, D. "Screening and Isolation of Protease Producing Bacteria from Soil Collected from Different Areas of Burhanpur Region (MP) India". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* Vol. 4, No. 8 (2015) 597-606.
- [28] Gomma, E.Z. "Optimization and Characterization of Alkaline Protease and Carboxymethyl-cellulase Produced by *Bacillus pumillus* Grown on *Ficus nitida* Wastes". *Brazilian Journal of Microbiology* Vol. 44, No. 2 (2013) 592-537.