

Produksi Enzim Protease *Aspergillus Flavus* Pam-25 Dengan Variasi Ph Dan Waktu Inkubasi

Indra Prawira, Isworo Rukmi, Wijanarka

Progam studi Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof Soedarto SH, Tembalang 50275

Abstrak

Enzim merupakan biokatalisator yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi tanpa ikut bereaksi. Enzim protease merupakan salah satu enzim yang memiliki nilai ekonomi tinggi karena aplikasinya sangat luas pada bidang industri. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalis pemutusan ikatan peptida pada protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi pH dan waktu inkubasi terhadap produksi enzim protease dari *A. flavus* PaM-25. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Variabel yang diamati adalah aktivitas protease, kadar protein dan aktivitas spesifik. Penelitian menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 2 faktor. Faktor pertama berupa perbedaan pH, P₁ (pH 7), P₂ (pH 8), dan P₃ (pH 9), sedangkan faktor kedua adalah waktu inkubasi T₅(hari ke-5), T₆(hari ke-6) dan T₇(hari ke-7) dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Data penelitian dianalisis dengan Analysis of variance (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil dan Uji Beda Nyata Duncan pada taraf uji 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Aspergillus flavus* PaM-25 memiliki kemampuan menghasilkan enzim protease alkali dengan rentang pH 7,0-9,0. Aktivitas protease tertinggi *A. flavus* PaM-25 diperoleh pada perlakuan waktu inkubasi 7 hari dengan nilai aktivitas protease 1.94 U/mL, sedangkan perlakuan pH tidak berpengaruh. Kadar protein tertinggi terdapat pada perlakuan pH 7 dan waktu inkubasi 5 hari sebesar 1.05 mg/mL. Nilai kemurnian enzim tertinggi terdapat pada kombinasi perlakuan pH 9 dan waktu inkubasi 7 hari sebesar 12.91 U/mg protein.

Kata Kunci : Protease, A. flavus PaM-25, pH medium, Waktu Inkubasi.

ABSTRACT

Enzyme is a biokatalisator which can increase the speed of the reaction without join react. Protease enzyme is one of the enzymes that have a high economic value because its application is extensive in the field of industry. Protease is an enzyme that catalyzes the proteolytic peptide bonds in proteins termination. This research aims to determine the effect of pH and incubation time on the production of protease enzyme from *A. flavus* PaM-25.. This research aims to know the influence of the variation of the pH of the incubation time and against the production of the enzyme protease of *A. flavus* PaM-25. The research was conducted at the laboratories of Microbiology Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, University of Diponegoro. Variables observed were protease activity, protein content and specific activity. Research using randomized complete block design (RAK) with two factors. The first factor is variation of pH, P₁ (pH 7), P₂ (pH 8), and P₃ (pH 9), while the second factor is the incubation time T₅ (5th day), T₆ (6th day) and T₇ (7th day) with repeated 3 times. Research data analyzed by Analysis of variance (ANOVA) and continued by Least Significant Difference test and Duncan Significant Difference Test at test level 5%. The results showed that the *Aspergillus flavus* PaM-25 has the capability of producing alkaline protease enzymes with pH range 7.0-9.0. The highest activity of proteases of *A. flavus* PaM-25 retrieved on 7th day incubation time of treatment with protease activity value 1.94 U/mL, while pH treatment has no effect. The highest levels of protein found in the treatment of pH 7 and 5th days of incubation time of 1.05 mg/mL. The value of the highest purity of enzymes found in the combination of treatment pH 9 and 7th day incubation time of 12.91 U/mg protein.

Key words: Protease, A. flavus PaM-25, pH, Incubation Time.

I. PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu dalam bidang bioteknologi telah menempatkan penggunaan enzim sebagai salah satu alternatif untuk keperluan dalam bidang industri. Enzim protease merupakan salah satu enzim yang memiliki nilai ekonomi tinggi karena aplikasinya sangat luas dalam bidang industri seperti deterjen, kulit, tekstil dan pengolahan limbah (Martins & Nascimento, 2006). Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh (Soeka *et al.*, 2011). Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease yang digunakan mencapai 59% dari total penjualan enzim yang berada diseluruh dunia (Huang *et al.*, 2006).

Sebagian besar enzim protease yang digunakan dalam bidang industri dihasilkan oleh mikroorganisme, terutama bakteri dari genus *Bacillus* dan beberapa kapang dari genus *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* (Sandhya *et al.*, 2005). Kapang alkalotoleran dapat mensintesis enzim spesifik yang mampu aktif di kondisi alkalis dan enzim ini sangat penting dalam proses industri (Gadd, 2004).

Berdasarkan pH optimumnya protease dapat digolongkan menjadi 3 yaitu asidik, netral, dan alkalis. Protease alkalis dapat dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, misalnya *Bacillus*, *Pseudomonas* dan jamur seperti *A.niger*, *A. flavus* dan *A.oryzae* (Preetha, 2012). Penelitian eksplorasi jamur peghasil protease alkalis yang telah dilakukan oleh banyak peneliti membuktikan bahwa jamur dari genus *Aspergillus*, memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim protease alkalis ekstraseluler (Anandan *et al.*, 2007). Protease ekstraseluler mempunyai kepentingan komersial dan memiliki kegunaan dalam berbagai macam industri yang digunakan sebagai agen pengurai protein dalam proses

pembuatan berbagai produk industri (Khan, 2013).

Keuntungan produksi enzim oleh jamur adalah biaya produksi yang rendah, produktivitas yang tinggi dan cepat, serta mudah dimodifikasi untuk mengoptimalan produksi enzim. Beberapa penelitian mengenai tingkat produktivitas enzim protease dari genus *Aspergillus* seperti *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger* diketahui masih tergolong rendah (Li *et al.*, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi pH dan waktu inkubasi terhadap produksi enzim protease dari *A. flavus* PaM-25. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pH medium dan waktu inkubasi yang optimal untuk produksi enzim protease oleh *A. flavus* PaM-25, sehingga dapat dimanfaatkan untuk proses fermentasi pada industri tekstil, kulit dan deterjen dalam skala besar.

II. METODE PENELITIAN

Peremajaan isolat

Sebanyak satu jarum ose *A. flavus* PaM-25 yang berasal dari isolat murni dalam stok miring diambil dan diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Czapex Dox Agar (modified)*, kemudian diinkubasi 5 hari pada suhu ruang.

Karakterisasi *A. flavus* PaM-25.

Karakterisasi dilakukan dengan mengamati ciri makroskopis dan mikroskopis jamur. Pengamatan makroskopik meliputi warna koloni, diameter, tekstur, dan warna sebalik koloni (*reverse of colony*), celah radial koloni (*radial furrow*) dan adanya uap air (*exudates drops*). Isolat diamati dibawah mikroskop untuk melihat bentuk hifa, spora, metula, fialid, konidiofor, dan vesikel.

Preparasi inokulum dan enumerasi spora

Kultur kapang yang berusia 120 jam dalam medium *Czapex Dox Agar (modified)*

ditambahkan 5 mL NaCl Twin 80% kedalamnya. Pelepasan spora dilakukan dengan menggunakan jarum inokulasi. Perhitungan jumlah spora dilakukan dengan metode TPC (*Total Plate Count*) secara duplo. Starter yang digunakan mempunyai kepadatan $2,16 \times 10^8$ spora/mL.

Produksi Protease (Charles *et al*, 2008)

Isolat jamur ditumbuhkan selama 5 hari pada medium miring berisi *Czapek Dox Agar (modified)*. Sebanyak 0,5 mL dari suspensi spora (10^8 spora/mL) isolat kapang diinokulasikan ke dalam medium *Czapek dox liquid (modified)* 50 mL yang mengandung (g/L): Sucrose (30), KCl (0.5), $MgSO_4$ (0.5), $FeSO_4$ (0.01), K_2HPO_4 (1.0), $NaNO_3$ (2.0), Casein (10) (variasi pH 7,8,9). Buffer fosfat ditambahkan ke dalam medium.

Kultur selanjutnya diinkubasi suhu ruang pada *Rotary Shaker* dengan kecepatan 120rpm, dan diambil pada waktu inkubasi 5,6,7 hari. Enzim yang telah diproduksi selanjutnya disaring dengan kertas Whatman no 1 hingga mendapatkan supernatan yang merupakan Enzim kasar, selanjutnya disentrifugasi 10,000 rpm selama 20 menit pada suhu $4^{\circ}C$.

Penentuan Aktivitas Enzim

Aktivitas protease ditentukan berdasarkan kemampuan protease untuk menghidrolisis ikatan peptida pada substrat kasein 1% (w/v) selama 10 menit. Sebanyak 1 mL enzim ditambahkan dengan 1 mL kasein 1% (Kasein 1% w/v yaitu kasein yang dilarutkan dalam buffer untuk masing-masing pH) kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Larutan ditambahkan 3 mL *Trichloroacetic acid* 10% (TCA), kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum tirosin (275nm). Satuan unit aktivitas protease (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghidrolisis

kasein menjadi asam amino bebas (produk) tiap menit. Perhitungan aktivitas enzim ditentukan dengan cara:

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{X}{t \cdot \text{BM}} \times 100$$

Keterangan:

- X : Konsentrasi tirosin (mg/mL)
- BM : Berat molekul tirosin (g/mol)
- t : Waktu inkubasi (menit)

Penentuan kadar protein

Penentuan kadar protein dengan Metode Lowry (Plummer, 1979). Sebanyak 0,1 mL larutan ekstrak kasar enzim (variasi pH 7,8 dan 9) ditambah 9,8 mL Na_2CO_3 dan 0,1 mL K-Na-tatrat serta 0,1 mL $CuSO_4$ dikocok secara perlahan. Kemudian diinkubasi dengan 1 mL *folin-Ciocalteau* secara cepat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA dengan spektrofotometer UV-Vis. Kadar protein ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar BSA dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Protein (mg protein/mL)} = \frac{y - c}{m}$$

Keterangan:

- y : Absorbansi Sampel
- c : Slope pada kurva standar BSA
- m : Intersep pada kurva standar BSA

Penentuan aktivitas spesifik enzim

Aktivitas spesifik enzim didapat dengan menentukan unit aktivitas enzim dibagi dengan kadar protein enzim. Dengan demikian rumus yang digunakan yaitu:

$$(\text{unit/mg protein}) = \frac{\text{Unit aktivitas (Unit)}}{\text{Kadar protein (mg)}}$$

Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan pola faktorial.

Percobaan melibatkan dua faktor, yaitu pH medium dan waktu Inkubasi. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Taraf pH yang digunakan adalah P₁ (pH 7), P₂ (pH 8), dan P₃ (pH 9), sedangkan waktu inkubasi T₅(hari ke-5), T₆(hari ke-6) dan T₇(hari ke-7). Data yang diperoleh diuji dengan anova dan dilanjutkan dengan uji t.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi *Aspergillus flavus* PaM-25

Isolat *Aspergillus flavus* PaM-25 yang digunakan sebagai penghasil enzim protease

pada penelitian ini merupakan isolat murni yang berasal dari tanah kapur di Madura, Jawa Timur. Karakterisasi kapang dilakukan dengan mengamati ciri mikroskopis dan makroskopis yang ditumbuhkan pada beberapa medium, antara lain *Malt Extract Agar* (MEA), *Czapek Dox Agar* (CZ), *Czapek Yeast Agar + 20% sucrose* (CY20S), CYA25, dan CYA37 (Klich, 2002).

Ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis dari hasil pengamatan digunakan untuk melihat karakteristik kapang *A. flavus* PaM-25 dengan membandingkan menurut Klich (2002) dan Samson *et al.* (2010).

Tabel 1. Ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis *A. flavus* PaM-25 yang ditumbuhkan pada beberapa medium

Pengamatan	Jenis Medium				
	MEA	CYA25	CYA37	CY20S	CZ
Makroskopis					
Warna Koloni	Hijau	Hijau kekuningan	Hijau	Hijau	kuning
Permukaan koloni (atas)	Granular	Granular	Granular	Granular	Granular
Permukaan koloni (bawah)	putih	putih	putih	putih	putih
Ukuran koloni	55,8 mm	45,9 mm	50,5 mm	78,8 mm	31,7 mm
Mikroskopis					
Konidia					
-Bentuk	Globose	Globose	Globose	Globose	Globose
-diameter	4-5 μm	4 μm	4 μm	4-6 μm	3-4 μm
-Permukaan	Halus	Halus	Halus	Halus	Halus
Konidiofor					
-Panjang	270-500 μm	250-450 μm	310-550 μm	330-550 μm	250-400 μm
-Diameter	8-10 μm	8-9 μm	9-12 μm	8-13 μm	7-8 μm
-Permukaan	Kasar	kasar	Kasar	Kasar	Kasar
Vesikel					
-Bentuk	Globose	Globose	Globose	Globose	Globose
-Diameter	30-35 μm	26 μm	30 μm	31-38 μm	20-32 μm
Metula					
-Panjang	10,5 μm	6 μm	7 μm	7 μm	6 μm
-Warna	Hialin	Hialin	Hialin	Hialin	Hialin
Fialid					
-Panjang	5-8 μm	5 μm	6 μm	6 μm	5 μm
-Warna	Hialin	Hialin	Hialin	Hialin	Hialin
Sifat lain					
Exudates drop	-	-	-	-	-
Radial furrow	+	+	-	+	-

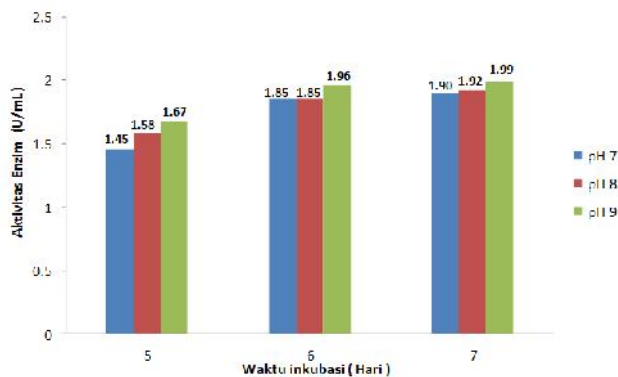
Aktivitas protease *A. flavus* PaM-25

Produksi enzim protease *A. flavus* PaM-25 dapat diketahui melalui aktivitasnya

dalam memecah substrat kasein. Sel dapat mensintesis protease sebagai reaksi terhadap senyawa pemicu (inducer) pada medium. Protease termasuk enzim yang bersifat inducibel karena sintesisnya memerlukan inducer yaitu kasein. Adanya kasein pada medium menyebabkan sel mensintesis protease.

Menurut Madigan *et al.* (2012) adanya mekanisme induksi dan represi membuat sel dapat mengatur kandungan dan aktivitas enzim sesuai kebutuhan sel dan kondisi nutriennya. Mekanisme induksi membuat sel lebih ekonomis dalam memanfaatkan nutrisi dari lingkungannya.

Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) terhadap aktivitas protease yang dihasilkan *A. flavus PaM-25* pada variasi pH 7,8 dan 9 menunjukkan bahwa berbeda tidak nyata pada perlakuan pH. Pada perlakuan waktu inkubasi hari ke 5,6 dan 7 menunjukkan nilai F hitung > F tabel 5% sehingga terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan waktu inkubasi, sedangkan kombinasi perlakuan antara keduanya berbeda tidak nyata karena nilai F hitung < F tabel 5%. Nilai rerata aktivitas enzim dari *A. flavus PaM-25* pada pengaruh variasi pH dan waktu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh variasi pH dan Waktu Inkubasi terhadap aktivitas protease *A. flavus PaM-25* (U/mL).

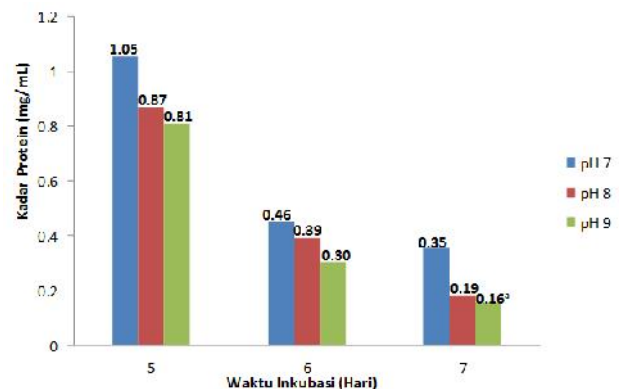
Berdasarkan Gambar 1 diatas dapat dilihat bahwa nilai tertinggi aktivitas enzim

protease *A. flavus PaM-25* berada pada perlakuan waktu inkubasi 7 hari dan pH 9 yaitu sebesar 1.99 U/mL. Hal tersebut menandakan bahwa pada waktu inkubasi 7 hari diduga *A. flavus PaM-25* berada pada fase logaritmik. Menurut Madigan *et al.* (2012), enzim digolongkan sebagai metabolit primer yang biasanya dibentuk pada fase pertumbuhan logaritmik. Pada fase ini pertumbuhan sel akan terjadi dengan cepat dan produksi enzim akan meningkat.

Aktivitas protease *A. flavus PaM-25* yang tertinggi dihasilkan pada pH 9, hal ini disebabkan karena lingkungan pH tersebut merupakan kondisi yang sesuai bagi pertumbuhan *A. flavus PaM-25*. Kondisi pH lingkungan yang sesuai merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi metabolisme suatu mikroorganisme termasuk *A. flavus PaM-25*, sehingga dalam kondisi tersebut dapat mensintesis protease secara optimal. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Preetha (2012), bahwa *A. niger* menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada pH 8,5 (0,60 U/mL), sedangkan *A. flavus* pada pH 9.0 (0,495 U/mL).

Kadar protein *A. flavus PaM-25*.

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui aktivitas spesifik enzim dari *A. flavus PaM-25*. Nilai rerata aktivitas enzim dari *A. flavus PaM-25* pada pengaruh variasi pH dan waktu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh variasi pH dan waktu Inkubasi terhadap kadar protein enzim *A. flavus PaM-25* (mg/mL).

Berdasarkan Gambar 2 nilai kadar protein tertinggi dihasilkan pada perlakuan pH 7 dan waktu inkubasi 5 hari. Hasil analisis sidik ragam (ANOVA) terhadap kadar protein *A. flavus PaM-25* pada variasi pH 7,8 dan 9 menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada perlakuan pH. Pada perlakuan waktu inkubasi hari ke 5,6 dan 7 menunjukkan nilai F hitung > F tabel 5% sehingga terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan waktu inkubasi, sedangkan kombinasi perlakuan antara keduanya berbeda tidak nyata karena nilai F hitung < F tabel 5%.

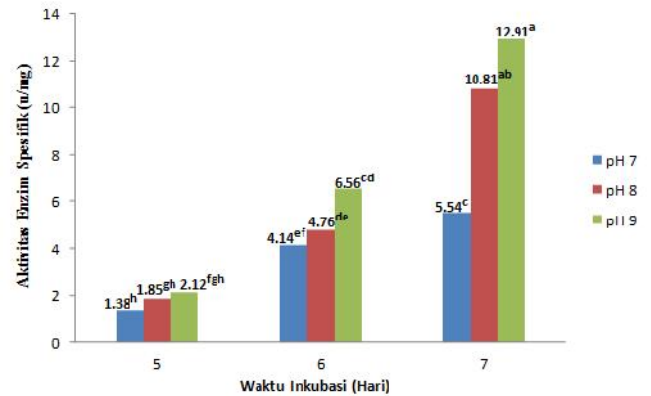
Enzim merupakan suatu protein, sehingga jumlah enzim yang tinggi dapat tergambar dari tingginya kadar protein. Pemecahan substrat kasein menjadi asam amino dibutuhkan sebagai bahan penyusun protein. Menurut Campbell *et al.* (2010) berdasarkan fungsinya protein dibedakan menjadi protein fungsional dan protein struktural. Protein fungsional contohnya adalah enzim-enzim pencernaan, sedangkan protein struktural digunakan untuk pertumbuhan seperti pembentukan sel. Penurunan kadar protein enzim pada waktu inkubasi 5-7 hari kemungkinan disebabkan *A. flavus PaM-25* berada pada fase logaritmik. Pada fase logaritmik *A. flavus PaM-25* membutuhkan banyak protein untuk pertumbuhan miselia.

Aktivitas spesifik enzim *A. flavus PaM-25*

Aktivitas spesifik enzim diperoleh dengan cara membandingkan nilai aktivitas enzim dengan kadar protein enzimnya. Nilai rerata kadar protein *A. flavus PaM-25* pada pengaruh variasi pH dan waktu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA) terhadap aktivitas spesifik yang dihasilkan kapang *A. flavus PaM-25* pada variasi pH medium, waktu inkubasi dan interaksi antara keduanya menunjukkan

F hitung yang lebih besar dari F tabel 5%. Artinya, perbedaan pH medium, waktu inkubasi dan kombinasi keduanya berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas spesifik *A. flavus PaM-25*.



Gambar 3. Pengaruh variasi pH dan waktu Inkubasi terhadap aktivitas enzim spesifik *A. flavus PaM-25* (U/mg).

Keterangan: angka dengan superskrip huruf yang berbeda menunjukkan hasil perlakuan yang berbeda nyata pada taraf uji 5%.

Gambar 3 menunjukkan aktivitas spesifik enzim tertinggi terdapat pada perlakuan pH 9 dan waktu inkubasi 7 hari yaitu sebesar 12.91 U/mg.

IV. KESIMPULAN

Aktivitas protease tertinggi *A. flavus PaM-25* diperoleh pada perlakuan waktu inkubasi 7 hari dengan nilai aktivitas protease 1.94 U/mL, sedangkan perlakuan pH tidak berpengaruh. Kadar protein tertinggi terdapat pada perlakuan pH 7 dan waktu inkubasi 5 hari sebesar 1.05 mg/mL. Aktivitas enzim spesifik tertinggi terdapat pada kombinasi perlakuan pH 9 dan waktu inkubasi 7 hari sebesar 12.91 U/mg protein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan matematika UNDIP yang telah membantu dalam terlaksananya penelitian ini, dan kepada Ibu Isworo Rukmi dan Bapak Wijanarka yang telah membimbing tugas akhir penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Campbell, NA., Reece J.B, Urry L.A., Cain., M.L., and Jackson. 2010. Biology. Edisi 8 Jilid 1. *Alih Bahasa*: Damaring tyas. Penerbit Erlangga, Jakarta. 84-93.
- Charles, P., Devanatan, P., Anbu, M.N., Ponnuswamy, P.T Kalaichevlan & Byung-Ki Hur. 2008. Purification, Characterization and Crystallization of an Ekstracellular Alkaline Protease from *Aspergillus nidulands* H.A-10. *J. Bas. Microbiol.* 48: 347-352.
- Gadd, M.G. 2004. Mycotransformation of Organic and Inorganic Substrates. *Mycologist* 18:60.
- Huang. G, Ying T., Huo P.& Jiang J. 2006. Purification and characterization of a protease from thermophilic *Bacillus* strain HS08. *African Biotechnol* 5: 2433 – 2438.
- Khan, F. 2013. New Microbial Proteases in Leather and Detergent Industries. *Innov.Res Chemistry* 1: 1-6.
- Klich, M.A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. United States Department Agriculture Lousiana, USA.18-20.
- Li-Jung Yin, Ya-Hui Chou, and Shann-Tzong Jiang. 2013. Purification and Characterization Acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 20118. *Int. J, Marine science and technology* 21:105-110.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., & Clark, D.P. 2012. Biology of Microorganism, 13th Edition, Prentice-Hall Internastional inc, Wisconsin. 55-59.
- Martins M.L.L, & Nascimento, W.C.A. 2006. Studies On Stability Of Protease From *Bacillus* sp. and Its Compability With Commercial Detergen. *Brazilia.Microbiol.* 37: 307–311.
- Plummer, David T. 1979. An Introduction to Practical Biochemistry, Second Edition, Tata McGaraw-Hill Publishing Company, New Delhi.
- Preetha, P. 2012. Comperative study on production of the alkaline protease enzyme from free and immobilized mycellia of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *Discovery life* 1(1):18-25.
- Samson, R.A., Varga, J., Witiak, S.M., and Geiser, D.M.. 2010. Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, Netherlands. 45-48.
- Sandhya. C. Sumantha. A, zakacs. G. dan Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem* 40: 2689 – 2694.
- Soeka, Y.S., Rahayu, S.H., Setianingrum, N., Naiola, E. 2011. Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam Memproduksi Enzim Protease yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Media Litbangkes* 21:2-5.