J. Sains MIPA, Agustus 2011, Vol. 17, No. 2, Hal.: 59 - 66
ISSN 1978-1873

PENGARUH PENAMBAHAN SORBITOL TERHADAP STABILITAS ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus licheniformis*

Yandri A.S. dan Ibadurrahman

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, Bandar Lampung 35145
E-mail: yandrias@unila.ac.id

ABSTRACT

This research aims to study to effect of addition of sorbitol towards the stability of protease from *B. licheniformi.* The purified enzyme has optimum pH and temperature of 6.0 and 50^{o}C, respectively. After being added with sorbitol, the enzyme has has optimum pH and temperature of 6.5 and 50^{o}C, respectively. The addition of sorbitol was able to increase the thermal stability of protease incubated at 50^{o}C for 200 minutes. The purified enzyme has residual activity of 17.2% with k_i value of 0.0087 min.$^{-1}$. The enzymes with addition of sorbitol concentration of 0.5 M, 1 M, and 1.5 M have residual activity of 28.9%; 44.7%; and 45.3%, respectively. The addition of sorbitol has increased the thermal stability of protease up to twice compared to the purified one. The highest stability was obtained by the addition of sorbitol 1 M.

Keywords: *protease, B. licheniformis, sorbitol*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan sorbitol terhadap stabilitas enzim protease dari *Bacillus licheniformis*. Enzim hasil pemurnian memiliki pH optimum 6,0 dan suhu optimum 50^{o}C. Sedangkan enzim setelah penambahan sorbitol mempunyai pH optimum 6,5 dan suhu optimum 50^{o}C. Penambahan sorbitol dapat meningkatkan stabilitas termal enzim protease yang diinkubasi pada suhu 50^{o}C selama 200 menit. Enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa 17,2%, dengan nilai k_i 0,0087 menit^{-1}. Sedangkan enzim setelah penambahan sorbitol (konsentrasi 0,5 M, 1 M, dan 1,5 M) mempunyai aktivitas sisa berturut-turut 28,9%; 44,7%; dan 45,3%, dengan nilai k_i berturut-turut 0,0054 menit^{-1}, 0,0042 menit^{-1}, dan 0,0045 menit^{-1}. Penambahan sorbitol dapat meningkatkan stabilitas termal enzim protease hingga dua kali lipat dibandingkan dengan stabilitas termal enzim protease hasil pemurnian. Peningkatan stabilitas enzim yang terbaik diperoleh pada enzim dengan penambahan sorbitol 1 M, dengan peningkatan kestabilan 2 kali.

Kata kunci: *protease, B. licheniformis, sorbitol*

1. PENDAHULUAN

Enzim protease adalah enzim yang banyak digunakan dalam industri, enzim ini dapat menghidrolisis ikatan peptida protein. Protease telah banyak dimanfaatkan baik di dalam industri pangan maupun non-pangan. Dalam industri pangan, protease digunakan misalnya dalam industri roti, keju, dan daging. Sedangkan dalam industri non-pangan, protease digunakan misalnya dalam industri kulit dan deterjen[1,2)].

Enzim dapat dihasilkan oleh hewan, tumbuhan, dan mikroba. Menurut Neidleman[3)], enzim yang berasal dari mikroba umumnya paling bagus untuk pemanfaatan komersial. Alasannya adalah bahwa produk mikroba dapat dihasilkan dalam jumlah banyak tanpa batasan yang mungkin terjadi karena pengaruh musim dan letak geografis, seperti yang mungkin terjadi pada enzim yang berasal dari tumbuhan. Protease komersial sebagian besar diperoleh dari bakteri *Bacillus licheniformis*[1)].

Meskipun enzim mempunyai keunggulan yang luar biasa daripada katalisator sintetik, namun penggunaan enzim dalam sektor industri memerlukan beberapa persyaratan tertentu, di antaranya enzim harus stabil pada suhu tinggi (termostabil) dan tahan pada kondisi pH yang ekstrim. Syarat tersebut tidak dimiliki oleh semua enzim, karena pada umumnya enzim bekerja pada kondisi fisiologis dan tidak tahan pada kondisi yang ekstrim[4)].

Enzim memiliki rentang pH dan suhu optimum tertentu untuk reaksi enzimatik, penjagaan stabilitas pH optimum enzim terhadap pengaruh perubahan keasaman atau kebasaan lingkungan menjadi sangat penting, karena pada pH yang jauh dari rentang pH optimumnya tersebut sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya (inaktivasi) secara cepat dan *irreversible*. Inaktivasi tersebut terjadi karena

© 2011 FMIPA Universitas Lampung

unfolding molekul protein enzim sebagai hasil dari *alterasi* (perubahan) kesetimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen[5]. Dalam proses industri yang memanfaatkan enzim, akan sangat mungkin terjadi kondisi lingkungan yang ekstrim untuk suatu reaksi enzimatik yang menyebabkan enzim keluar dari rentang pH optimumnya, bila hal ini terjadi dan dibiarkan maka penggunaan enzim dalam sektor industri tidak lagi menarik.

Kondisi ini mendorong lahirnya pemikiran dan upaya-upaya untuk meningkatkan stabilitas enzim, di antaranya adalah penggunaan zat aditif sebagai penstabil, modifikasi kimia struktur enzim, derivatisasi, kristalisasi dan penggunaan protein *engineering*[6]. Penggunaan zat aditif sebagai penstabil merupakan metode yang paling sederhana yang dapat digunakan untuk meningkatkan aktivitas dan stabilitas enzim.

Zat aditif sebagai penstabil yang mudah digunakan adalah poliol (alkohol polihidrat). Penggunaan golongan alkohol sebagai zat aditif penstabil memiliki beberapa kelebihan, yaitu meningkatkan stabilitas dan lama waktu simpan enzim, sifat hidrofilik dari gugus hidroksilnya dapat menurunkan aktivitas air, dan dapat meningkatkan interaksi hidrofobik di antara molekul protein enzim, serta dapat bekerja sebagai penangkap atau pengikat senyawa radikal bebas sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya oksidasi enzim[1].

Akan tetapi tidak semua golongan alkohol memberikan efek penstabilan, alkohol monohidrat dan pelarut lain yang sifatnya lebih hidrofilik seperti etanol biasanya menurunkan stabilitas struktur asli enzim. Umumnya enzim lebih stabil disimpan di dalam etilen glikol dibandingkan dengan metanol. Senyawa-senyawa golongan alkohol yang telah terbukti meningkatkan stabilitas enzim diketahui dapat menimbulkan hidrasi sehingga konformasi protein terjaga dari kemungkinan *unfolding*[1].

Pada penelitian ini digunakan satu jenis poliol yaitu sorbitol, jenis ini memberikan efek penstabilan paling baik dibanding jenis poliol lain yang umum digunakan, hal ini sebagaimana yang dilaporkan oleh Bernier dan Stutzenberger[7]. Sorbitol ditambahkan pada larutan enzim protease setelah tahap pemurnian dan karakterisasi enzim, kemudian pemeriksaan kestabilan dilakukan dengan variasi beberapa konsentrasi sorbitol untuk melihat pengaruh penambahannya terhadap stabilitas enzim protease.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Prosedur Penelitian

2.1.1. Produksi enzim protease

Tahap produksi protease meliputi : penentuan lama waktu inkubasi untuk mendapatkan enzim dengan aktivitas tertinggi, dan penentuan pH optimum media fermentasi. Media fermentasi yang digunakan adalah media *T-salts*[10], yang mengandung (per liter): 150 mg $MgSO_4$ 7 H_2O, 125 mg $MgCl_2$ 6 H_2O, 1 mg $MnCl_2$ 4 H_2O, dan 50 mg $CaCl_2$ 2 H_2O dilarutkan dalam 50 mM buffer fosfat pH 7,4. Kultur pertumbuhan untuk ekstrak protease mengandung *T-salts* yang ditambahkan dengan sebanyak 0,5 gr pepton, 0,15 gr *yeast extract*, 0,25 gr NaCl dan 20 mM glukosa (0,36 gr). Sebelum digunakan disterilkan terlebih dahulu dalam autoklaf pada tekanan 15 psi selama 15-20 menit.

2.1.2. Isolasi dan pemurnian enzim protease

Isolasi dan pemurnian dilakukan beberapa tahap, yaitu : pemisahan cairan enzim dari sel dengan sentrifuga dingin sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim, pengendapan dengan garam amonium sulfat dengan berbagai tingkat kejenuhan, kromatografi kolom penukar ion[8,9].

2.1.3. Uji aktivitas dan penentuan kadar protein enzim protease

Pengujian aktivitas enzim protease dilakukan dengan metode Kunitz yang dimodifikasi[11]. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry[12].

2.1.4. Karakterisasi enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Karakterisasi enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol meliputi: penentuan pH optimum, penentuan stabilitas termal dan penentuan data termodinamika.

1. Penentuan pH optimum enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Larutan sorbitol ditambahkan kepada enzim dengan perbandingan 1 : 1 (enzim : sorbitol) menghasilkan konsentrasi sorbitol dalam campuran 0,5; 1,0; dan 1,5 M. Selanjutnya enzim dikondisikan pada

© 2011 FMIPA Universitas Lampung

variasi pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 dan 9. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan menggunakan metode *Kunitz*. Sebagai kontrol, enzim hasil pemurnian diinkubasi pada variasi pH yang sama.

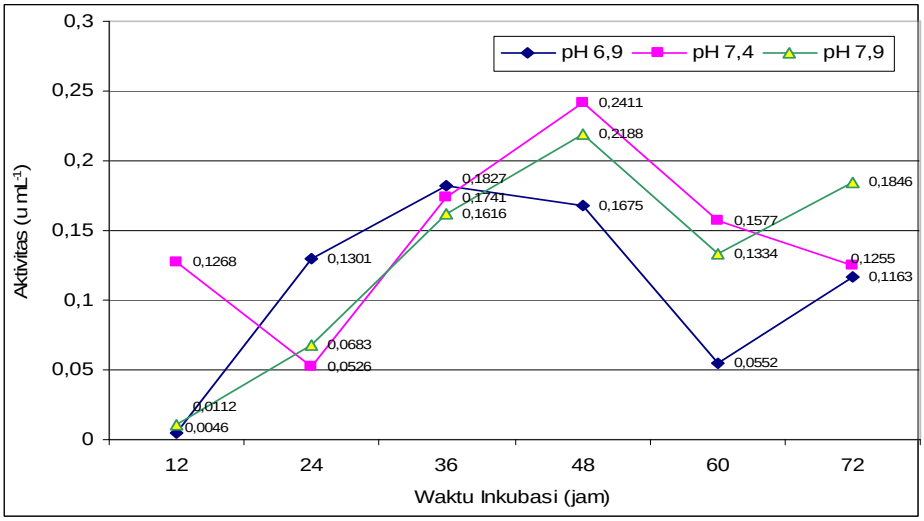
2. Penentuan stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Campuran enzim dan sorbitol (0,5; 1,0; dan 1,5 M), diinkubasi pada pH 6,5 dan suhu 50 ^{o}C selama 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, dan 200 menit. Pada setiap interval waktu pengamatan tersebut dilakukan uji aktivitasnya. Sebagai kontrol, enzim hasil pemurnian diberikan perlakuan yang sama dengan campuran enzim dan poliol.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Penentuan Kondisi Optimum *Bacillus licheniformis* untuk Menghasilkan Enzim Protease

Hubungan antara aktivitas unit enzim protease pada berbagai pH dengan lama waktu inkubasi untuk menghasilkan enzim protease ditunjukkan pada Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan bahwa *Bacillus licheniformis* mampu menghasilkan enzim protease dengan aktivitas terbaik (0,24 u ml^{-1}) dalam media pertumbuhan cair termodifikasi dengan pH 7,4 dan waktu inkubasi selama 48 jam. Setelah tercapai aktivitas optimum terjadi penurunan aktivitas enzim. Hal ini dapat disebabkan telah berkurangnya komponen di dalam medium yang menjadi penginduksi sintesis enzim atau substrat. Faktor lain yang mungkin terjadi adalah saling hidrolisis antar protease akibat tidak adanya lagi protein yang dapat dipecah[13].



Gambar 1. Hubungan antara aktivitas unit enzim protease pada berbagai pH dan lama waktu inkubasi

3.2. Isolasi dan Pemurnian Enzim

3.2.1. Isolasi enzim

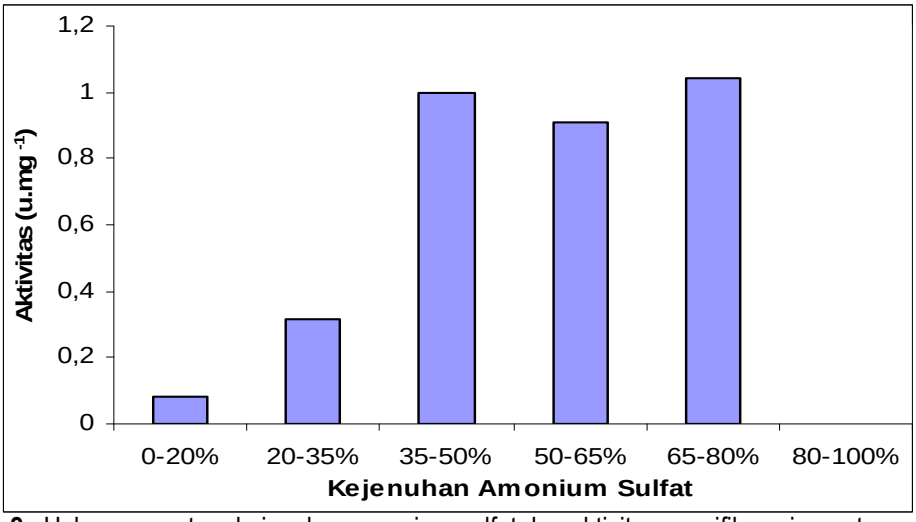
Tahap ini bertujuan untuk memisahkan enzim dari sel menggunakan sentrifius dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit, sehingga diperoleh ekstrak kasar (*crude*) enzim. Dalam percobaan ini diperoleh filtrat berwarna kuning kecoklatan, dengan aktivitas unit 0,26 u ml^{-1} dan aktivitas spesifik 0,12 u mg^{-1}.

3.2.2. Pemurnian enzim

1. Fraksinasi dengan amonium sulfat

Hubungan antara fraksi enzim pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim hasil pengendapan ditunjukkan pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan enzim protease mengendap pada fraksi 2, 3, 4 dan 5, atau pada kejenuhan amonium sulfat 20-80% dengan aktivitas spesifik berturut-turut 0,32; 1,00; 0,91 dan 1,04 u mg^{-1}. Fraksi 20-80% ini menjadi acuan proses pemurnian lebih lanjut.

© 2011 FMIPA Universitas Lampung



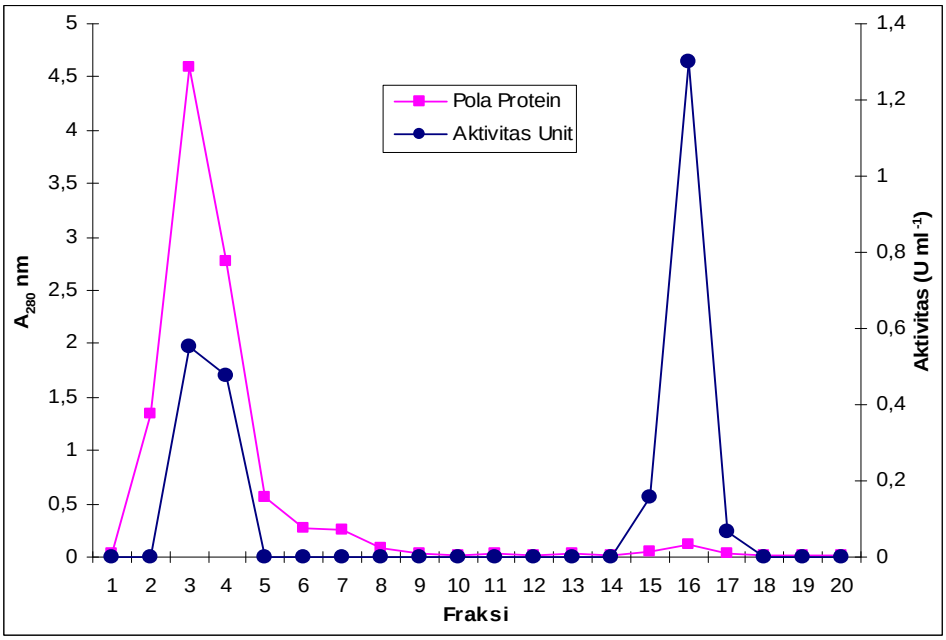
Gambar 2. Hubungan antara kejenuhan amonium sulfat dan aktivitas spesifik enzim protease

2. Dialisis

Endapan yang diperoleh dari fraksinasi dengan amonium sulfat masih mengandung garam dan ion-ion lainnya, oleh sebab itu untuk memperoleh enzim yang lebih murni maka garam dan ion-ion tersebut dihilangkan pada tahap ini. Uji terhadap enzim setelah dialisis menunjukkan adanya peningkatan aktivitas spesifik menjadi 1,70 u mg^{-1}, dan peningkatan kemurnian menjadi 14,2 kali.

3. Kromatografi kolom penukar ion

Pemurnian enzim dengan kromatografi kolom CM-Sephadex C-50 diawali dengan penentuan pH bufer yang sesuai untuk penukar kation tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein enzim terikat baik pada pH 5, sehingga digunakan bufer fosfat 0,05 M pH 5 sebagai bufer awal (bufer pengikatan). Sebagai bufer elusi protein yang terikat digunakan bufer fosfat 0,02 M pH 7 yang mengandung 0,1 M NaCl. Pola protein (A_{280} nm) dan aktivitas portease hasil kromatografi kolom CM-Sephadex C-50 dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kromatogram enzim protease pada kolom CM-Sephadex C-50

© 2011 FMIPA Universitas Lampung

Gambar 3 menunjukkan terdapat beberapa puncak protein yang tinggi yaitu pada fraksi ke-3 dan ke-16, namun aktivitas terbaik ditunjukkan pada fraksi ke-16, dengan aktivitas spesifik 10,82 u mg^{-1} dan kadar protein yang rendah. Enzim hasil pemurnian selanjutnya dilakukan karakterisasi dan pengujian stabilitas. Skema pemurnian enzim protease dari *Bacillus licheniformis* dapat dilihat pada Tabel 1.

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa pada tahap pengendapan dengan amonium sulfat terjadi pemisahan enzim yang cukup baik, ditunjukkan dengan peningkatan kemurnian menjadi 14,2 kali. Sedangkan pada tahap kromatografi kolom enzim protease memiliki tingkat kemurnian yang tinggi yaitu 90,2 kali. Hasil ini menunjukkan bahwa proses pemurnian yang dilakukan telah berlangsung dengan baik dan metode pemurnian yang dipilih sesuai untuk pemurnian enzim protease dari *Bacillus licheniformis.*

Tabel 1. Skema pemurnian enzim protease dari *Bacillus licheniformis*

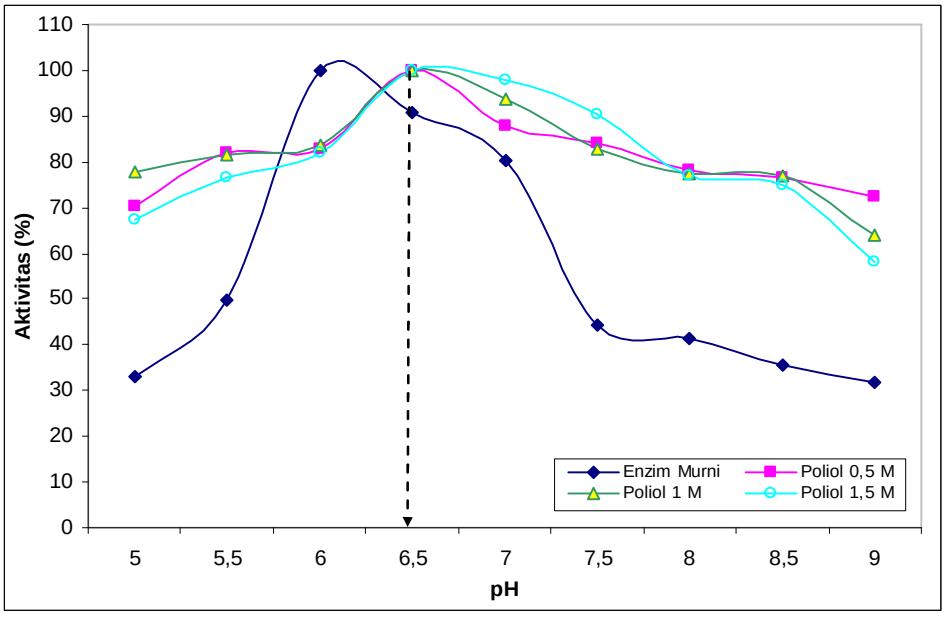
Tahap	Vol. (ml)	Aktivitas Unit (u/ml)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik (u/mg)	Tingkat Kemurnian (kali)	*Recovery* (%)
Ekstrak Kasar	1895	0,26	2,18	0,12	1	100
Fraksinasi 20-80% setelah dialisis	175	1,37	0,80	1,70	14,2	48,7
Kromatografi Penukar Ion CM-Sephadex C-50	140	1,30	0,12	10,82	90,2	36,9

Perolehan (*recovery)* enzim setelah kedua tahap pemurnian di atas berturut-turut 48,7 dan 36,9% . Perolehan (%) yang semakin kecil menunjukkan bahwa komponen-komponen selain enzim terpisahkan selama tahap pemurnian. Hal ini ditunjukkan juga oleh data kadar protein yang terus berkurang selama proses pemurnian. Selain itu penurunan perolehan disebabkan enzim kehilangan aktivitas selama proses pemurnian.

3.3. Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian dan Setelah Penambahan Sorbitol

3.3.1. pH optimum enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol

Pengaruh penambahan sorbitol pada enzim hasil pemurnian dengan beberapa variasi konsentrasi terhadap pH dapat dilihat pada Gambar 4. Data pada Gambar 4 menunjukkan enzim setelah penambahan sorbitol mengalami kenaikan pH optimum menjadi 6,5.

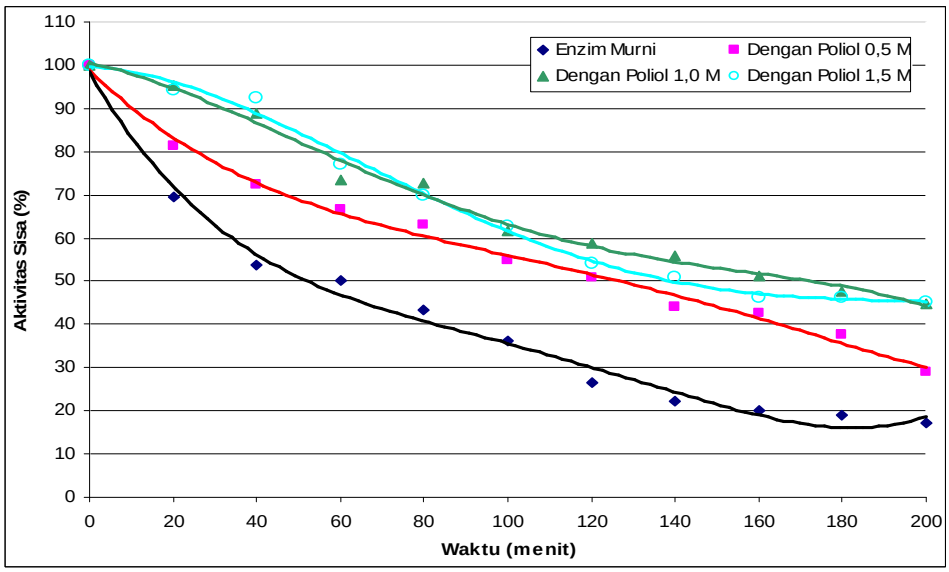


Gambar 4. pH optimum enzim protease hasil pemurnian dan enzim protease setelah penambahan sorbitol

Sedangkan enzim hasil pemurnian mempunyai pH optimum 6,0. Gambar 4 juga menunjukkan bahwa terjadi peningkatan stabilitas enzim protease setelah penambahan sorbitol terhadap pH pada pH asam maupun pH basa. Enzim setelah penambahan sorbitol cukup stabil antara pH 5,0 sampai pH 9,0, sedangkan enzim hasil pemurnian hanya stabil antara pH 6,0 sampai pH 7,0 dan mengalami penurunan aktivitas yang tinggi pada pH di bawah dan di atas pH tersebut. Hasil ini menunjukkan sorbitol dapat meningkatkan stabilitas enzim protease pada pH asam maupun basa.

3.3.2. Stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol

Aktivitas sisa (*residual activity*) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol dengan beberapa konsentrasi, ditentukan dengan menginkubasi setiap enzim tersebut pada pH 6,5 dan suhu 50 ^{o}C selama 200 menit. Pada interval waktu tertentu setiap enzim ditentukan aktivitasnya. Hasil uji stabilitas enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol dapat dilihat pada Gambar 5, yang menunjukkan aktivitas sisa setiap enzim pada pH 6,5 dan suhu 50 ^{o}C selama 200 menit. Enzim hasil pemurnian mempunyai aktivitas sisa 17,2%, sedangkan enzim dengan penambahan sorbitol (konsentrasi 0,5 M, 1 M, dan 1,5 M) mempunyai aktivitas sisa berturut-turut 28,9%; 44,7%; dan 45,3%. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim dengan penambahan sorbitol mempunyai kestabilan yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian tanpa penambahan sorbitol.



Gambar 5. Hubungan antara aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol terhadap waktu, pada suhu 50 ^{o}C.

3.2.3. Penentuan harga perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), k_i dan waktu paruh enzim hasil pemurnian dan sesudah penambahan sorbitol.

Nilai k_i, perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), dan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan setelah penambahan sorbitol, dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai k_i, perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i), dan waktu paruh ($t_{1/2}$) enzim hasil pemurnian dan enzim setelah penambahan sorbitol

Enzim	k_i (menit^{-1})	(ΔG_i) (kJ mol^{-1})	$t_{1/2}$ (menit)
Hasil Pemurnian	0,0087	103,1	79,7
Poliol 0,5 M	0,0054	104,3	128,3
Poliol 1,0 M	0,0042	105,0	165
Poliol 1,5 M	0,0045	104,8	154

© 2011 FMIPA Universitas Lampung

Nilai k_i (konstanta laju inaktivasi termal), semakin kecil k_i menunjukkan stabilitas yang semakin menigkat. Waktu paruh yang semakin tinggi menunjukkan enzim semakin stabil. Begitu juga perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) yang semakin besar menunjukkan enzim semakin stabil dan tidak mudah terdenaturasi. Hasil penelitian menunjukkan enzim dengan penambahan sorbitol 1 M mengalami peningkatan stabilitas paling baik dengan peningkatan kestabilan 2 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian (berdasarkan penurunan nilai k_i).

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut: Enzim protease dihasilkan secara optimum oleh *Bacillus licheniformis* pada pH 7,4 dan lama waktu inkubasi selama 48 jam. Aktivitas spesifik protease dari *Bacillus licheniformis* hasil pemurnian 10,82 u mg^{-1} protein, meningkat 90,2 kali dibanding dengan ekstrak kasar yang hanya 0,12 u mg^{-1} protein. Proses pemurnian dengan kromatografi penukar ion CM-Sephadex C-50 memiliki peran yang sangat signifikan.

Enzim protease dari *Bacillus licheniformis* hasil pemurnian mengalami pergeseran harga pH optimum dari pH 6,0 menjadi 6,5 setelah penambahan sorbitol. Penambahan sorbitol dapat meningkatkan stabilitas termal enzim protease sebesar 2 kali dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian, hal ini ditunjukkan dengan terjadinya penurunan nilai k_i enzim hasil pemurnian setelah penambahan sorbitol. Nilai k_i enzim hasil pemurnian 0,0087 $menit^{-1}$, sedangkan nilai k_i enzim dengan penambahan sorbitol 0,5 M; 1 M; dan 1,5 M berturut-turut adalah 0,0054; 0,0042; dan 0,0045 $menit^{-1}$.

4.2. Saran

Dalam penelitian berikutnya penulis menyarankan untuk dilakukan peningkatan stabilitas enzim menggunakan senyawa alkohol polihidrat jenis lain, atau dengan metode peningkatan stabilitas yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Suhartono, T.M. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.

2. Vieille, C. and Zeikus, J.G. 1996, Thermozymes: Identifying molecular determinant of protein structural and functional stability, *Tibtech*., **14** (6): 183-189.

3. Neidleman, S.L. 1991. *Produksi Bahan Biokimia dari Mikroba*. Di dalam Jean L. Marx (ed). Revolusi Bioteknologi. Terjemahan Wildan Yatim. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta. Hlm: 131-163.

4. Goddette, D.W., Terri, C., Beth, F.L., Maria, L., Jonathan, R.M., Christian, P., Robert, B.R., Shiow, S.Y. and Wilson, C.R. 1993. Strategy dan Implementation of A System For Protein Engineering. *J. Biotechnol*., **28** (1): 41-54.

5. Kazan, D., Ertan, H., *and* Erarslan, A. 1996. Stabilization of Penicillin G Acylase Against pH by Chemical Cross-Linking. *J. Process Biochemistry*, **33** (2): 135-140.

6. Illanes, A. 1999. Stability of Biocatalysts. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. **2** (1): 1-9.

7. Bernier, R. F., and Stutzenberger, F.J. 1988. Stabilization of β-glucosidase by polyhydric alcohols. *J. Bacteriol*., **7**:293-298.

8. Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods*. 2nd ed. John Wiley *and* Sons, Inc., Publiction, New York.

9. Yandri, Herasari, D. dan Suhartati, T. 2007. Isolasi, pemurnian dan karakterisasi enzim protease termostabil dari bakteri isolat lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *Jurnal Sains MIPA*, Edisi khusus, **13** (2): 100- 106.

10. Bernlohr, R.W. and Clark, V. 1970. Characterization and regulation of protease synthesis and activity in Bacillus licheniform*is*. *J. Bacteriol*., **105**: 276-283.

11. Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I. and Kiso, H. 1982. Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit and miut: occurence and partial characterization, *Agric. Biol. Chem*., **46**: 1983-1986.

12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951, Protein measurment with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem*., 193-265.

13. Jenie, B.S.L., dan Tedjokusumo, L. 1994. Produksi Protease oleh *Bacillus licheniformis* Menggunakan Medium Limbah Kepala Udang Windu dan Ampas Tapioka. *Bul. Teknol. dan Industri Pangan,* **5** (2)**:** 1-8.

© 2011 FMIPA Universitas Lampung