

**PENGARUH PENAMBAHAN CaCl_2 TERHADAP PRODUKSI
ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus licheniformis* HSA3-1a**

HERLINA KANDOLLA'
H 311 07 030



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**PENGARUH PENAMBAHAN CaCl_2 TERHADAP PRODUKSI
ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus licheniformis* HSA3-1a**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

HERLINA KANDOLLA'

H311 07 030



MAKASSAR

2013

SKRIPSI

**PENGARUH PENAMBAHAN CaCl_2 TERHADAP PRODUKSI
ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus licheniformis* HSA3-1a**

Disusun dan diajukan oleh

HERLINA KANDOLLA'

H311 07 030

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:

Pembimbing Utama

**Dr. Hj. Hasnah Natsir M.Si
NIP. 19620320 198711 2 001**

Pembimbing Pertama

**Dr. Maming, M.Si
NIP. 19570228 198703 1 001**

Ketika Kegagalan menjadi suatu keberhasilan, ketika air mata berganti menjadi senyum yang paling indah, ketika semua usaha menghasilkan buah yang baik, ketika mimpi itu berada di genggamanku, disaat itulah aku menyadari bahwa semua yang ada sudah digariskan oleh

DIA YANG MAHA PENGASIH

I LOVE YOU JESUS

Kupersembahkan karya kecil ini kepada. Ayah dan ibu
tercinta serta saudara-saudaraku

PRAKATA

Segala puji, syukur, hormat, dan kemuliaan yang tiada terbatas hanya kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala anugrah dan penyertaanNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik seturut dengan kehendakNya. Terima kasih Tuhan, Engkau membuktikan semuanya menjadi indah pada waktunya. Skripsi yang berjudul “**Pengaruh Penambahan CaCl_2 Terhadap Produksi Enzim Protease dari *Bacillus licheniformis* HSA3-1a**” ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Ungkapan terima kasih yang mendalam dan penuh ketulusan sebagai bakti dan hormat penulis persembahkan kepada kedua orang tua tercinta, ayahanda **M.B Saruran** dan ibunda **Hermin Saalino, S.P** atas cinta kasih yang tulus, doa dan dukungan yang tiada henti dalam segala aspek kehidupan penulis, serta kesabaran membimbing penulis khususnya dalam menuntut ilmu. Terima kasih kepada saudaraku **kak Emma, kak Lilis, kak Gusti, kak Ikka, Salling, Ade** dan **Aldi** yang juga senantiasa memberikan doa dan semangat sebagai bentuk rasa cinta kasih kepada penulis, serta ponakan ku tercinta **Aurel, Tisha, Kamaya** dan **Kinawa** yang menjadi sumber semangat saat melihat wajahnya.

Keberhasilan penulis sampai pada tahap penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, baik materil maupun spiritual dari lingkungan penulis. Karena itu penulis menghaturkan terima kasih kepada :

1. **Dr. Hj. Hasnah Natsir, M. Si** dan **Dr. Maming, M.Si** selaku pembimbing yang telah meluangkan banyak waktunya untuk membimbing penulis dengan segala kemampuan dan pemikiran dari awal rencana penelitian hingga terselesainya skripsi ini dan juga kepada **Alm. Prof. Noor Jalaluddin** yang selama hidupnya, Beliau selalu menjadi tempat menumpahkan keluh kesah penulis, meskipun pada akhirnya beliau tidak dapat menemani hingga saat ini, namun dalam hati penulis, Beliau akan tetap menjadi sosok ayah terbaik di kampus merah ini.
2. **Prof. Hanapi Usman, MS. Dr. H.Syarifuddin Liong, M. Si,** dan **Dr. Muhammad Zakir, M.Si.** selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi saran yang berharga.
3. **Dr. Firdaus Zenta, MS** selaku ketua Jurusan Kimia dan **Dr.Hj.Seniawti Dali M.Si** selaku sekretaris beserta seluruh dosen Jurusan Kimia, FMIPA, Unhas yang telah membagikan ilmu dan pengalamannya kepada penulis. Seluruh staff karyawan dan analis laboratorium terutama kepada **Kak Fibi,** , **Pak Idris, Pak Iqbal, Kak Linda** secara khusus kepada **Kak Anti** yang telah mengarahkan dan membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.
5. Keluarga Besar **Universitas Islam Negeri - SAMATA** yang telah menerima penulis dalam menyelesaikan penelitian secara khusus buat **Kak Fitri** selaku analis di Lab. Biokimia UIN-Samata yang selalu menemani dan membantu serta menjadi penyemangat penulis.
6. Keluarga Besar Mahasiswa Kimia angkatan **2006, 2008, 2009, 2010 dan 2011** terima kasih untuk kebersamaan dan tawa serta canda yang kalian

berikan, terkhusus buat **Adriani** yang tak pernah mengenal lelah menemani penulis saat melakukan penelitian di UIN-Samata Gowa dan **Unhy** yang selalu setia menemani dan membuat penulis tetap tersenyum meskipun sedang menghadapi masalah... thanks sist... I love u

7. *My inspiration* n teman-teman terbaikku “*cherzs*” kimia angkatan 2007, **Charmi, Bia, Uki’, Muce’, Tenri, Fahmi, Kiki, Evi, Nita, Risal, Dian, Justin, Irwan, Tanti, Avril, Leang, Muli, Agnes, Norma, Nita, Isa, Ria Armas, Ame’, Nila, Mia, suri, Riri’, Nurhayati, Isa, Novi, Irma, Adiman.**

Terima kasih telah hadir menemani baik dalam susah maupun senang.

You all are my closer friends...Don’t stop fighting until the end!!!

8. Teman-teman penelitian di Lab. Biokim :**Unhy, Adriani, Evo, Nani, Irwan, Nano’, Fitri, Devi, Nia, Evi, K’ Edar, dan K’ ammank** terima kasih untuk pengertian, segala bentuk bantuan, dan kebersamaan dalam mengerjakan penelitian, serta memberikan hiburan dalam menghadapi masa-masa sulit selama penelitian. *Thank’s a lot friends!!!!*

9. *My second family* **Korps Pencinta Alam Universitas Hasanuddin (KORPALA UNHAS)** kakak-kakak dan teman-teman semua terkhusus saudaraku, **DDXXII, Jalal, Nanank, Rhani, Kasma, Cummink, Baso’, Fadli, dan Ucam** terima kasih karena telah hadir mengisi hari-hari penulis. Sungguh suatu kebahagiaan ketika bercanda diantara barisan pinus lembanna, belajar mengartikan kehidupan, menikmati dinginnya embun pagi, dan belajar bekerja sama di bawah atap **Mabes KORPALA** tercinta.

Thank’s for everything...SURVIVE WITH KORPALA...

10. Teman-teman **TWEXO, Andi, Oland, Suri', Rio, Noris, Nova, Vin, Sinta** yang selalu menyemangati penulis serta memberikan dukungan selama ini dan juga teman-teman **Pandu Alam Lingkungan (PAL) Fadli, Kia, Natan, Takke, Daud, Ana, Karla, Indra, Rian, Fajar**, pokoknya semua yang sudah menjadi teman penulis, yang sudah menjadi penyemangat dan membuat penulis tersenyum disaat menghadapi masalah. Selamanya kalian akan menjadi sahabat sejatiku.

Penulis sepenuhnya menyadari akan segala kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karenanya, penulis berharap adanya kritik dan saran yang membangun untuk lebih menyempurnakan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat kepada siapapun yang membutuhkan.

Makassar, Februari 2012

Penulis

ABSTRAK

protease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi monomer asam amino. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu produksi, konsentrasi CaCl_2 suhu dan pH optimum serta pengaruh kofaktor terhadap aktivitas enzim protease dari *B. licheniformis* HSA3-1a. Aktivitas enzim protease diuji dengan metode Walter yang telah dimodifikasi. Waktu produksi optimum protease adalah selama 60 jam dengan nilai aktivitas 0,0561 Unit/mL pada konsentrasi CaCl_2 0,015%, kadar protein 2,0165 mg/mL. Aktivitas pH optimum enzim protease adalah pH 7 dengan nilai aktivitas 0,0104 U/mL. Sedangkan suhu optimum aktivitas enzim protease adalah 50°C sebesar 0,012 U/mL, serta stabil pada penambahan CaCl_2 pada konsentrasi 0,015 M dengan nilai aktivitas relatif 100%.

Kata kunci: Protease; Enzim; Aktivitas enzim; *B. licheniformis*

ABSTRACT

Protease is an enzyme that can hydrolyze proteins to be amino acid monomers. This study aims to determine the production time of production, the concentration of CaCl_2 optimum temperature and pH, as well as the influence of cofactors for enzyme activation protease of *B. licheniformis* HSA3-1a. Protease enzyme actitested was tested by Walther Method that have been modified. Protease optimum production time is over 60 hours of activation values 0,0561 U/mL at the CaCl_2 concentration 0,015%, the level of protein 2,0165 mg/mL. The activity pH optimum enzyme protease 7,0 with activity value 0,0104 U/mL. While the optimum temperature of the enzyme activation protease is at 50°C for 0,012 U/mL, and stable to the addition of CaCl_2 at the concentration of 0,015M with a value of 100% relative activation.

Key word : Protease; enzyme; enzyme activity; *B. licheniformis*

DAFTAR ISI

	halaman
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Maksud Penelitian	3
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Uraian Umum Tentang Bakteri.....	5
2.1.1 Pertumbuhan Bakteri.....	5
2.1.2 Pengaruh Beberapa Unsur terhadap Pertumbuhan Bakteri	7
2.1.3 Mikroorganisme Penghasil Protease.....	9
2.1.4 <i>Bacillus licheniformis</i>	10
2.2 Uraian Umum Tentang Enzim.....	11

2.2.1	Penggolongan Enzim.....	13
2.2.2	Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	14
2.3	Enzim Protease.....	17
2.3.1	Mekanisme Kerja Enzim Protease.....	18
2.3.2	Aplikasi Enzim Protease.....	20
BAB III	METODE PENELITIAN.....	22
3.1	Bahan Penelitian	22
3.2	Alat Penelitian.....	22
3.3	Metode Penelitian	23
3.3.1	Pembuatan Medium Padat	23
3.3.2	Pembuatan Media Inokulum.....	23
3.3.3	Pembuatan Media Produksi	23
3.3.4	Peremajaan Mikroba Isolat <i>Bacillus licheniformis</i> HSA3-1a.....	24
3.3.5	Penyiapan Inokulum.....	24
3.3.6	Penentuan Konsentrasi Optimum CaCl_2 serta Waktu Produksi Optimum Enzim.....	24
3.3.7	Produksi Enzim Protease Ekstraseluler.....	25
3.3.8	Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	25
3.3.9	Uji Aktivitas Protease.....	26
3.3.10	Penentuan pH Optimum.....	27
3.3.11	Penentuan Suhu Optimum	27
3.3.12	Penentuan Pengaruh Senyawa Kofaktor terhadap Aktivitas Enzim.....	27

BAB	IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
	4.1	Penentuan Konsentrasi Optimum CaCl_2 serta Waktu Optimum Produksi Enzim Protease	28
	4.2	Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	31
	4.3	Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Protease dari <i>B.</i> <i>licheniformis HSA3-1a</i>	33
	4.4	Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Protease dari <i>B.</i> <i>licheniformis HSA3-1a</i>	34
	4.5	Pengaruh Senyawa Kofaktor terhadap Aktivitas Enzim Protease dari <i>B. licheniformis HSA3-1a</i>	36
BAB	V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	38
	5.1	Kesimpulan	38
	5.2	Saran	38
DAFTAR PUSTAKA.....			39
LAMPIRAN			43

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Fungsi fisiologis umum dari setiap unsur dalam sel bakteri,	8
2. Mikroorganisme penghasil protease.....	9
3. Aplikasi protease dari berbagai sumber.....	21
4. Data hasil penentuan konsentrasi optimum CaCl_2 dan waktu optimum produksi enzim protease dari <i>Bacillus licheniformis</i> HSA3-1a.....	28
5. Data pengukuran kadar protein protease pada panjang gelombang 670 nm.....	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Kurva pertumbuhan mikroba.....	6
2. Bentuk sel dari bakteri <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a.....	10
3. Teori Kunci gembok dan teori kecocokan induksi	12
4. Kalsium (Ca)	16
5. Struktur Enzim Protease.....	17
6. Mekanisme pembentukan senyawa antara asilenzim.....	18
7. Mekanisme reaksi protease aspartat pada reaksi pemutusan ikatan peptida.....	19
8. Penentuan konsentrasi optimum CaCl_2 serta waktu produksi optimum enzim protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a.....	30
9. Kadar protein protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a selama waktu fermentasi.....	32
10. pH Optimum Enzim Protease dari <i>B.s licheniformis</i> HSA3-1a 1a pada [S] = 2,0%; suhu 50°C	33
11. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a pada [S] = 2,0%; pH 7.....	35
12. Pengaruh senyawa kofaktor terhadap aktivitas protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a pada [S] = 2,0%; pH 7; suhu 50°C.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Isolasi Protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a.....	43
2. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	44
3. Skema Pengujian Aktivitas Enzim Protease	45
4. Peremajaan Bakteri <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a dengan penambahan CaCl ₂	46
5. Peremajaan Bakteri <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a tanpa penambahan CaCl ₂	46
6. Penentuan Zona Hidrolisi <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a.....	47
7. Penyiapan Medium Produksi Enzim Protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a	47
8. Kurva standar Bovin Serum Albumin pada λ 670 nm.....	48
9. Data pengukuran Kadar Protein dari Enzim Protease.....	48
10. Data Penentuan pH Optimum Enzim Protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a.....	50
11. Data pengukuran aktivitas protease dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a terhadap pengaruh suhu.....	50
12. Data pengaruh kofaktor (CaCl ₂) terhadap aktivitas protease dari <i>B.licheniformis</i> HSA3-1a.....	51

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Abl	: nilai absorbansi blanko
Asp	: nilai absorbansi sampel
Ast	: nilai absorbansi standart
BSA	: Bovine Serum Albumin
BM	: Berat Molekul
HSA3-1a	: Hasnah Sulili Air Lokasi 3-1a
M	: molar
ml	: milliliter
mg	: milligram
MSM	: Medium Sintetik Minimum
nm	: nanolimeter
OD	: Optical Density
P	: faktor pengenceran
pH	: potensial hidrogen
rpm	: rotate per minute
<i>sp.</i>	: spesies
T	: waktu inkubasi (menit)
UA	: unit aktivitas enzim
UV/Vis	: Ultraviolet/Visible
U/ml	: Unit per milliliter
°C	: derajat celcius
[S]	: substrat
%	: persen
λ	: lambda

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati di Indonesia yang terdiri dari berbagai jenis tumbuhan, hewan dan mikroba memiliki potensi dalam produksi enzim. Produksi enzim dari mikroba banyak dikembangkan karena dapat diproduksi dengan waktu cepat dalam skala besar pada lingkungan yang dapat dikontrol dan bekerja sangat spesifik dan efisien. Berbagai jenis isolat mikroba telah diketahui memiliki peranan yang besar sebagai penghasil enzim yang berguna dalam industri.

Penggunaan enzim pada berbagai industri saat ini semakin berkembang, baik untuk industri pangan maupun non pangan. Dalam industri, enzim digunakan sebagai bahan alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri, diagnosis penyakit, analisis biologi molekuler, transformasi senyawa kimia, dan pengolahan limbah dalam lingkungan. Enzim ini sebagai biokatalisator pada berbagai reaksi kimia seperti: reaksi hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerisasi, adisi, transfer gugus, dan terkadang pemutusan rantai karbon (Falch, 1991).

Protease merupakan enzim golongan hidrolase yang memiliki nilai ekonomi tinggi karena aplikasinya yang sangat luas antara lain: industri deterjen, penyamakan kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan pengolahan 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).

Penelitian tentang isolasi protease dan aplikasinya telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya seperti: Isolasi protease alkali termostabil dari *B. thermoglucosidasius* AF-01 oleh Fuad, dkk. (2004); isolasi protease dari bakteri patogen *Staphylococcus epidermidis* oleh Baehaki, dkk. (2005) dan penggunaan protease dari *Bacillus* sp. dalam mendeproteinasi lateks sebelum digunakan sebagai bahan pembuatan *sphgmomanometer* oleh Siswanto, dkk (2009).

Pertumbuhan mikroba membutuhkan senyawa kofaktor sebagai sumber mineral seperti, mangan, kalsium, besi, nitrogen, sulfur, dan magnesium, karena mikroba juga membutuhkan nutrisi yang lengkap. Salah satu hasil penelitian tentang pengaruh ion logam terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan oleh Susanto dan Sopiah (2003) yang melihat adanya pengaruh ion Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} dan Zn^{2+} terhadap pertumbuhan bakteri proteolitik.

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka akan dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan ion Ca^{2+} terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus licheniformis* *HAS3-1a* dan produksi enzim protease serta bagaimana stabilitas enzim protease tersebut. *B. licheniformis* *HSA3-1a* adalah bakteri termofil yang diisolasi dari sumber air panas Sulili-Pinrang (Natsir, dkk,2010).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah senyawa $CaCl_2$ berpengaruh terhadap produksi enzim protease dari *B. licheniformis* HSA3-1a?
2. Berapa konsentrasi $CaCl_2$ yang digunakan untuk memproduksi protease maksimum?

3. Berapakah pH dan suhu optimum enzim protease dari *B. licheniformis* *HSA3-1a*?
4. Berapakah konsentrasi kofaktor (CaCl_2) yang dapat meningkatkan aktivitas enzim protease dari *B. licheniformis* *HSA3-1a* ?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh penambahan senyawa CaCl_2 terhadap produksi enzim protease dari *B. licheniformis* *HSA3-1a*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menentukan aktivitas enzim protease dari *B. licheniformis* *HSA3-1a* dengan adanya senyawa CaCl_2 .
2. Menentukan konsentrasi optimum senyawa CaCl_2 terhadap produksi enzim protease dari *B. licheniformis* *HSA3-1a*.
3. Menentukan pH dan suhu optimum enzim protease *B. licheniformis* *HSA3-1a*
4. Menentukan konsentrasi kofaktor (CaCl_2) yang dapat meningkatkan aktivitas enzim protease dari *B. licheniformis* *HSA3-1a* ?

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh penambahan serta konsentrasi optimum dari senyawa CaCl_2 terhadap pertumbuhan bakteri *B. licheniformis* *HSA3-1a* sehingga proses produksi enzim protease semakin meningkat dan nantinya dapat dimanfaatkan dan dikembangkan

dalam semua bidang terutama bidang industri, pangan, famasi dan kesehatan guna meningkatkan kesejahteraan manusia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Uraian Umum Tentang Bakteri

Bakteri berasal dari bahasa Yunani yaitu “bakterion” yang berarti tongkat atau batang. Sekarang nama itu dipakai untuk menyebut sekelompok mikroorganisme yang bersel satu, tidak berklorofil, berkembang biak dengan membelah diri, karena demikian kecilnya sehingga hanya tampak dengan mikroskop. Bakteri dapat dari mana saja, misalnya dari rongga mulut, dari sela-sela gigi, dari tanah yang banyak terdapat sampah, dan sisa-sisa makanan yang sudah basi (Dwidjoseputro, 1998).

Bakteri banyak tersebar luas di alam, yaitu dalam tanah, atmosfer, lumpur, di laut, di dalam tubuh hewan, manusia dan tanaman. Jumlahnya bergantung pada keadaan sekitarnya, misalnya bakteri di dalam tanah jumlahnya bergantung pada jenis dan tingkat kesuburan tanahnya (Djide dan Sartini, 2005).

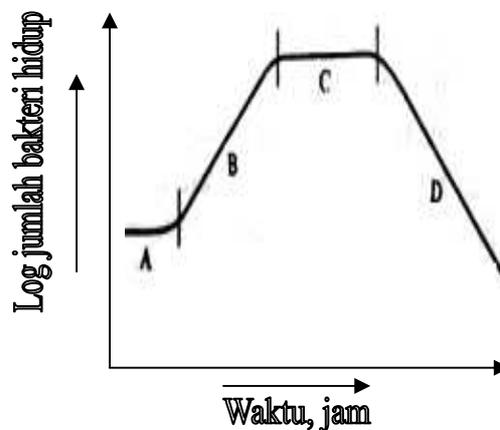
Bentuk tubuh bakteri dipengaruhi oleh keadaan medium dan usia. Bentuk serta besar kecilnya bakteri dapat dibandingkan dengan memperhatikan kondisi bakteri yang harus sama, temperatur dimana bakteri itu disimpan harus sama, penyinaran oleh sumber cahaya dan usia bakteri pun harus sama. Bakteri-bakteri yang menunjukkan kelainan-kelainan akan memperoleh bentuknya yang normal kembali apabila ditumbuhkan di dalam medium yang baru (Dwidjoseputro, 1998).

2.1.1 Pertumbuhan Bakteri

Bakteri umumnya melakukan proses reproduksi dengan cara pembelahan biner menghasilkan dua sel anakan dengan ukuran yang sama. Waktu yang

digunakan untuk membelah diri disebut waktu waktu generasi. Waktu generasi tidak selalu tepat tetapi tergantung pada faktor-faktor dalam medium, spesies, dan umur bakteri. Sel yang tumbuh akan berkembang ukurannya. Selama tumbuh, komponen sel seperti protein, RNA dan sebagainya akan bertambah sampai siap membelah. Pembelahan sel diawali dengan pertumbuhan dinding sel kearah dalam membentuk septa. Proses pemisahan dengan membelah sekat sehingga terbentuk dua sel anakan (Hidayat dkk, 2006).

Waktu yang dibutuhkan untuk satu kali siklus lengkap dalam bakteri sangat beragam dan bergantung pada sejumlah faktor baik faktor nutrisi maupun genetik (Ali, 2005). Menurut (Rachdie, 2006), faktor-faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba, yaitu: suplai nutrisi, suhu, keasaman atau kebasaaan (pH), dan ketersediaan oksigen.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan mikroba (Djide dan Sartini, 2005)

Kurva pertumbuhan mikroba (Gambar 1) merupakan gambaran dari pertumbuhan secara bertahap sejak awal hingga terhenti mengadakan kegiatan (Suriawiria, 2005). Kurva di bawah ini disebut sebagai kurva pertumbuhan bakteri. Menurut Prasetyo (2010), pertumbuhan bakteri terdiri atas 4 fase sebagaimana tampak pada kurva, yaitu:

1. Fase Lag (A)

Fase adaptasi. Pada fase ini terjadi reorganisasi konstituen makro dan mikro molekul. Ada yang lama ada juga yang cepat, bergantung pada kondisi lingkungan.

2. Fase Eksponensial (B)

Fase ini merupakan fase pertumbuhan sebenarnya. Jika dilihat dalam kurva akan dilihat kenaikan jumlah mikroba berdasarkan bertambahnya waktu.

3. Fase Stasioner (C)

Pada fase ini penambahan dengan pengurangan jumlah mikroba hampir sama. Sehingga di kurva dapat dilihat berupa garis lurus. Hal ini disebabkan karena mulai menipisnya jumlah nutrisi dalam médium yang ditempati.

4. Fase Kematian (D)

Ada kalanya setelah fase stasioner jumlah mikroba menurun. Hal ini karena habisnya nutrisi dalam media. Mikroba juga menghasilkan metabolisme sekunder yang hasilnya menjadi toksik untuk mikroba lainnya.

Menurut (Sofa, 2008). metode pengukuran pertumbuhan yang sering digunakan adalah dengan menentukan jumlah sel yang hidup dengan jalan menghitung koloni pada pelat agar dan menentukan jumlah total sel atau jumlah massa sel.

2.1.2 Pengaruh Beberapa Unsur terhadap Pertumbuhan Bakteri

Suplai nutrisi juga dibutuhkan dalam pertumbuhan bakteri. Pada tingkat dasar, kebutuhan nutrisi bakteri seperti *E. coli* yang diungkapkan oleh komposisi unsur sel, yang terdiri dari C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn, dan jejak Zn, Co, Cu, Mo dan unsur-unsur ini ditemukan dalam bentuk air, ion anorganik, molekul

kecil, dan makromolekul yang berfungsi baik peran struktural atau fungsional dalam sel (Kenneth, 2009).

Tabel 1. Fungsi fisiologis umum dari setiap unsur dalam sel bakteri (Kenneth, 2009).

Unsur	Berat kering (%)	Sumber	Fungsi
Karbon	50	Senyawa organik atau CO ₂	Bagian utama dari bahan selular.
Oksigen	20	Senyawa organik, H ₂ O, CO ₂ dan O ₂	Bagian penting dari bahan sel dan air sel; O ₂ adalah akseptor elektron dalam respirasi aerobik.
Nitrogen	14	NH ₃ , NO ₃ ²⁻ , senyawa organik dan N ₂	Bagian penting dari asam amino, asam nukleat nukleotida, dan koenzim.
Sulfur	1	SO ₄ ²⁻ , H ₂ S, S, senyawa organik sulfur	Bagian Penting dari sistein, metionin, glutation, beberapa koenzim.
Magnesium	0,5	Garam-garam magnesium	Kation seluler anorganik, kofaktor untuk reaksi enzimatik tertentu.
Kalsium	0,5	Garam-garam kalsium	Kation seluler anorganik, kofaktor untuk enzim tertentu dan komponen endospora.
Hidrogen	8	H ₂ O, senyawa organik dan H ₂	Bagian utama senyawa organik dan air sel.
Fosfor	3	Fosfat anorganik (PO ₄ ³⁻)	Bagian utama asam nukleat, nukleotida, fosfolipid, LPS.
Kalium	1	Garam-garam kalium	Anorganik utama seluler dan kofaktor untuk enzim tertentu.
Besi	0,2	Garam-garam besi	Komponen sitokrom dan beberapa zat besi nonheme-protein dan kofaktor untuk beberapa reaksi enzimatik.

2.1.3 Mikroorganisme Penghasil Protease

Sumber enzim menurut Kosim dan Putra (2010), yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan adalah mikroorganisme. 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.

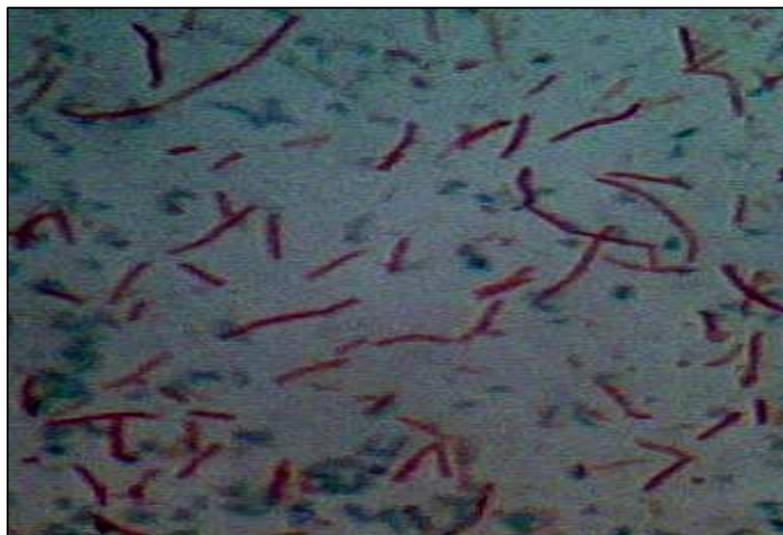
Tabel 2. Mikroorganisme penghasil protease

Sumber Protease	pH Optimum	Suhu Optimum (°C)	Aktivator	Pustaka
<i>Thermoplasma volcanium</i>	7,0	50	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Kocabiyik dan Ozdemir, 2006
<i>Bacillus subtilis</i>	7,5	60	Fe ²⁺	Setyorini dkk., 2006
<i>Bacillus clausii</i>	12,3	55	-	Saeki dkk., 2007
<i>Bacillus sp.</i> KSM-KP43	11-12	60	-	
<i>Curtobacterium luteum</i>	7	20	Zn ²⁺ , Cr ²⁺	Kuddus dan Ramteke, 2008
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	7,0	50	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Ren, dkk., 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	60	-	Karadzic, dkk., 2004
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	50	Fe ²⁺	Baehaki, dkk., 2005
<i>Bacillus licheniformis</i> Lbbl-11	7	50	-	Olajuyigbe dan Ajele, 2008

2.1.4 *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang dengan panjang antara 1,5 μm sampai 3 μm dan lebar antara 0,6 μm sampai 0,8 μm . Spora dari bakteri ini berbentuk batang silindris atau elips dan terdapat pada sentral atau parasentral. Suhu maksimum pertumbuhannya adalah 50–55°C dan suhu minimumnya 15°C. *B. licheniformis* merupakan spesies bakteri yang mampu menghasilkan protease dalam jumlah yang relatif tinggi dan enzim golongan hidrolase lainnya (Mao, dkk., 1992).

Bakteri termofil isolat HSA3-1a merupakan bakteri golongan *Bacillus* yang tumbuh pada suhu 45-55°C yang telah diketahui karakteristik morfologi dan fisiologinya. Sifat morfologi bakteri *B. licheniformis* HSA3-1a tersebut berbentuk batang, berspora, merupakan bakteri gram positif dan tidak bersifat motil. Sifat uji fisiologi bakteri tersebut positif terhadap uji katalase, oksidase, gelatin, inositol, voges proskaver, dan beberapa uji karbohidrat (Natsir dkk., 2010).



Gambar 2. Bentuk sel dari bakteri *B. licheniformis* HSA3-1a (Natsir dkk., 2010)

2.2 Uraian Umum Tentang Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang bekerja dengan urutan-urutan yang teratur. Enzim memiliki tenaga katalik yang luar biasa jauh lebih besar dari katalisator sintetik, selain itu spesifisitasnya amat tinggi terhadap substratnya. Enzim berperan dalam mempercepat reaksi kimia spesifik tanpa membentuk produk sampingan (Lehninger, 1982).

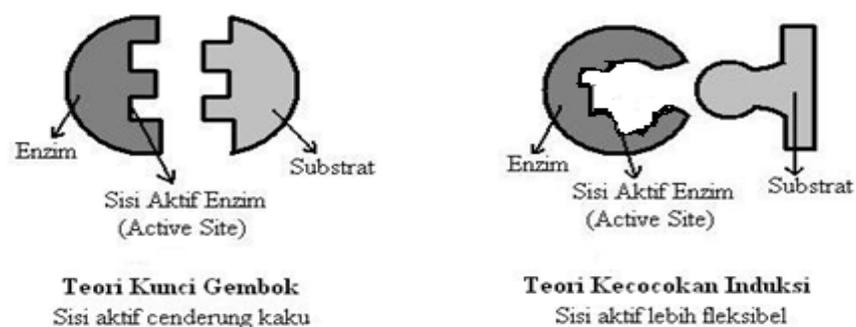
Enzim adalah suatu protein dan dihasilkan oleh sel hidup. Enzim adalah protein yang mempunyai fungsi khusus. Enzim bekerja dalam mengkatalisis reaksi kimia (biokimia) yang berlangsung di dalam sel itu sendiri. Fungsi utama suatu enzim ialah mengurangi hambatan energi reaksi pada suatu reaksi kimiawi. Enzim bergabung dengan substansinya (substrat) membentuk suatu status transisi yang membutuhkan energi aktivasi lebih kecil untuk berlangsungnya reaksi kimia tersebut (Pelczar, 1986).

Menurut (Poedjiadi, 1994), fungsi suatu enzim ialah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Jadi enzim dapat berfungsi sebagai katalis yang sangat efisien dan mempunyai derajat spesifitas yang tinggi. Seperti juga katalis lainnya, maka enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia.

Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah (1) dapat meningkatkan produk beribu kali lebih tinggi; (2) bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah; dan (3) bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu. Sifat-sifat tersebut menyebabkan penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun, diperkirakan peningkatan mencapai 10–15%

setiap tahun. Aplikasi enzim pada beberapa industri menghendaki enzim-enzim yang dalam beraktivitas tahan terhadap panas (termostabil) (Rahayu, 2004).

Suatu enzim mempunyai ukuran yang lebih besar daripada substrat. Oleh karena itu tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat (Poedjiadi, 1994). Enzim bekerja dengan dua cara, yaitu menurut teori kunci-gembok (*Lock and Key Theory*) dan teori kecocokan induksi (*Induced Fit Theory*), seperti terlihat pada Gambar 3. Menurut teori kunci-gembok, reaksi antara substrat dengan enzim terjadi karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan situs aktif (*active site*) dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, yang berperan sebagai gembok, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Berbeda dengan teori kunci gembok, menurut teori kecocokan induksi reaksi antara enzim dengan substrat berlangsung karena adanya induksi substrat terhadap situs aktif enzim sedemikian rupa sehingga keduanya merupakan struktur yang komplemen atau saling melengkapi. Menurut teori ini situs aktif tidak bersifat kaku, tetapi lebih fleksibel (Mulia, 2007).



Gambar 3. Teori kunci gembok dan teori kecocokan induksi (Mulia, 2007)

2.2.1 Penggolongan Enzim

Enzim digolongkan menurut reaksi yang diikutinya, sedangkan masing-masing enzim diberi nama menurut nama substratnya, misalnya urease, arginase dan lain-lain. Disamping itu ada pula beberapa enzim yang dikenal dengan nama lama misalnya pepsin, tripsin dan lain-lain. Oleh Commission on Enzymes of the internasional Union of Biochemistry, enzim dibagi dalam enam golongan besar. Penggolongan ini didasarkan atas reaksi kimia dimana enzim memegang peranan. Enam golongan tersebut adalah (Poedjiadi, 1994):

a) Oksidoreduktase

Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini dapat dibagi dalam dua bagian yaitu dehidrogenase dan oksidase. Dehidrogenase bekerja pada reaksi-reaksi dehidrogenasi, yaitu reaksi pengambilan atom hidrogen dari suatu senyawa (donor) dan diterima oleh senyawa lain (akseptor), sementara enzim-enzim oksidase juga bekerja sebagai katalis pada reaksi pengambilan hidrogen dari substrat. Dalam reaksi ini yang bertindak sebagai akseptor hidrogen adalah oksigen. Contoh enzim dehidrogenase adalah alkohol dehidrogenase, glutamat dehidrogenase dan lain-lain. Contoh enzim oksidase adalah xantin oksidase, glisin oksidase dan lain-lain.

b) Transferase

Enzim yang termasuk golongan ini bekerja sebagai katalis pada reaksi pemindahan suatu gugus dari suatu senyawa kepada senyawa lain. Beberapa contoh enzim yang termasuk golongan ini ialah metiltransferasi, hidrosimetiltransferase, karboksiltransfrasi dan lain-lain.

c) Hidrolase

Enzim yang termasuk dalam kelompok ini bekerja sebagai katalis pada reaksi hidrolisis. Ada tiga jenis hidrolase yaitu yang memecah ikatan ester, memecah ikatan glikosida, dan yang memecah ikatan peptida. Beberapa contoh enzim ini adalah esterase, amilase, peptidase dan lain-lain.

d) Liase

Enzim yang termasuk dalam golongan ini mempunyai peran penting dalam reaksi pemisahan suatu gugus dari suatu substrat atau sebaliknya tapi bukan dengan cara hidrolisis. Contoh enzim golongan ini adalah dekarboksilase, aldolase, dan hidratase dan lain-lain.

e) Isomerase

Enzim yang termasuk golongan ini bekerja pada reaksi perubahan intramolekular misalnya reaksi perubahan glukosa menjadi fruktosa, senyawa cis menjadi senyawa trans dan lain-lain. Contoh enzim yang termasuk golongan isomerase adalah ribulosafosfat epimerase dan glukosafosfat isomerase.

f) Ligase

Enzim yang termasuk golongan ini bekerja pada reaksi-reaksi penggabungan dua molekul. Oleh karenanya enzim-enzim tersebut juga dinamakan sintetase. Ikatan yang terbentuk dari penggabungan tersebut adalah ikatan C-O, C-S, C-N, atau C-C. Contoh enzim golongan ini antara lain ialah glutamin sintetase dan piruvat karboksilase.

2.2.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Reaksi enzimatik yang terjadi dapat dipengaruhi oleh kondisi fisiologi serta kandungan protoplasma sel (*in vivo*). Pengaruh ini agak berbeda dengan

reaksi enzimatik yang terjadi secara *in vitro*, selain itu ada beberapa faktor lain yang mempengaruhi aktivitas enzim yaitu: konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, suhu, inhibitor (Page, 1989).

a. Konsentrasi Substrat

Jika konsentrasi substrat rendah maka kecepatan reaksinya juga rendah, tetapi kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat (Lehninger, 1982).

b. Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi suatu enzim tergantung pada konsentrasi substratnya, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada konsentrasi substrat (Poedjiadi, 1994).

c. pH

Enzim mempunyai gugus aktif yang bermuatan positif (+) dan bermuatan negatif (-). Jika salah satu gugus aktifnya dipengaruhi maka aktivitas enzimnya juga akan berkurang, sebaliknya aktivitasnya akan optimum bila terdapat kesetimbangan antara kedua gugus aktifnya, dimana pH optimum untuk kegiatan suatu enzim tidak selalu sama tapi tergantung kepada kemurnian enzim, asal enzim, suhu, dan lain-lain. Enzim yang berasal dari sumber yang berbeda mempunyai pH optimum yang berbeda pula. Umumnya enzim memperlihatkan aktivitas maksimum pada pH optimum, yang lazimnya berkisar antara pH 4,5 sampai 8,0 (Winarno, 1986).

d. Suhu

Suhu dapat berpengaruh terhadap kecepatan reaksi enzim, naiknya suhu akan menaikkan kecepatan reaksi sampai kecepatan maksimum. Setelah itu kecepatan akan turun karena terjadi denaturasi termal terhadap enzim tersebut. Hal ini terjadi karena Enzim adalah suatu protein, maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi (Wirahadikusumah dan Madayanti, 1990).

e. Kofaktor

Bailey dan Ollis (1988), menyatakan bahwa salah satu karakteristik pembeda enzim dengan katalis sintetik adalah seringnya enzim memerlukan kofaktor. Kofaktor bisa berupa molekul anorganik, seperti ion Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} atau juga suatu molekul organik kompleks yang disebut koenzim seperti tiamin pirofosfat, FAD, serta koenzim A.

Ion Mg^{2+} dan Ca^{2+} sedikit meningkatkan aktivitas enzim protease dari *B. stearothermophilus*. Ion logam seperti Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , dan Zn^{2+} , dapat melindungi protease asam dari *Paecilomyces* terhadap inaktivasi oleh panas. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim protease dapat diurutkan dari yang kecil ke yang besar sebagai berikut: $\text{Hg}^+ < \text{Ag}^+ < \text{Fe}^{2+} < \text{Li}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Ba}^{2+}$ (Sukarno, dkk., 1995).

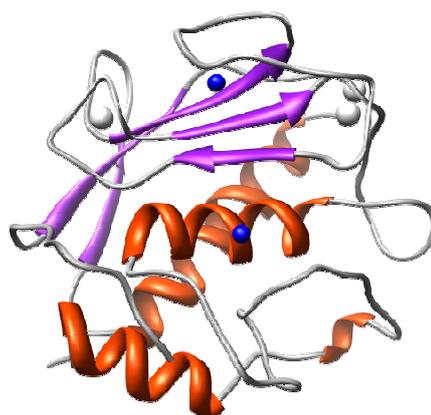


Gambar 4. Kalsium (Ca) (Anonim, 2012a)

Kalsium adalah sebuah elemen kimia dengan simbol Ca dan nomor atom 20. Mempunyai massa atom 40.078 berwarna putih perak, yang agak lunak (Gambar 4). Kalsium melebur pada 845°C. Kalsium membentuk kation kalsium(II), Ca^{2+} , dalam larutan air. Kalsium pertama kali diisolasi oleh Sir Humphry Davy, seorang kimiawan Inggris, yang melalui elektrolisis campuran CaO dan HgO pada tahun 1808 (Svehla, 1979).

2.3 Enzim Protease

Protease, disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Protease bersumber dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Saat ini protease dibutuhkan dalam skala tinggi yaitu meliputi dua per tiga dari enzim pasar dan banyak dimanfaatkan pada industri pangan maupun non pangan. (Smith 1995).



Gambar 5. Struktur Enzim Protease (Anonim, 2011b)

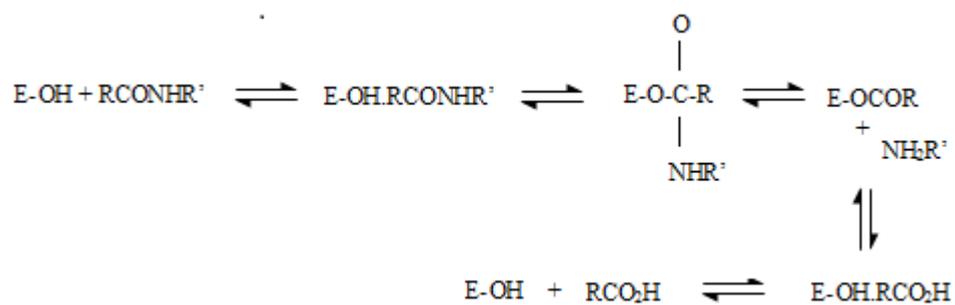
Uchikoba dkk. (2000) menemukan adanya macluralisin, serin protease dari tanaman keluarga mulberry yang telah diisolasi dari buah *Cudrania tricuspidata*. Menurut Moriyama dkk.(1998), berbagai jenis *Bacillus* menghasilkan sejumlah protease ekstraselular, dan protease alkalis disajikan dalam bentuk subtilisin yang memiliki hubungan evolusioner dengan enzim yang telah dikarakterisasi dengan sejumlah kemampuan umum dan struktur yang istimewa.

2.3.1 Mekanisme Kerja Enzim Protease

Berdasarkan mekanisme reaksinya, enzim protease dibagi menjadi 4 kategori (Walsh, 2002):

a. Protease Serin

Golongan protease serin memiliki residu serin pada pusat aktif enzim, menghidrolisis substrat peptida atau ester sintetik melalui mekanisme pembentukan senyawa antara asilenzim seperti pada persamaan reaksi berikut:



Gambar 6. Mekanisme pembentukan senyawa antara asilenzim (Fersht, 1985)

Enzim dan substrat mula-mula bergabung membentuk kompleks enzim-substrat. Gugus hidroksil Ser-195 berikatan dengan substrat membentuk senyawa antara tetrahedral. Senyawa antara ini bersifat tidak stabil, kemudian luruh (collapse) membentuk asilenzim dengan melepaskan amina atau alkohol.

Kemudian asilenzim terhidrolisis membentuk kompleks enzim-produk (Fersht, 1985).

b. Metaloprotease

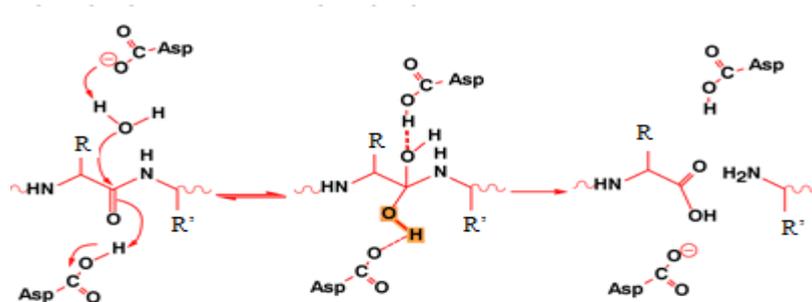
Metaloprotease merupakan nama dari protease yang dicirikan oleh ketergantungan pada ion logam bivalen untuk aktivitasnya. Mekanisme katalitik protease logam dengan menghidrolisis asam amino pada ujung C dari substrat polipeptida (Fersht, 1985).

c. Protease sistein

Berdasarkan spesifitas rantai samping, enzim ini dibedakan menjadi 4 kelompok yaitu protease serupa papain, dan yang serupa tripsin yang memotong protein pada residu arginin. Kelompok ketiga adalah protease yang spesifik memotong pada residu asam glutamat dan kelompok ke empat diluar kelompok kelompok ketiga tersebut di atas (Rao dkk., 1998).

d. Protease aspartat

Sebagian besar protease aspartat memiliki aktivitas maksimum pada pH 3 dan 4 serta memiliki titik isoelektrik antara 3 dan 4,5. Secara umum berat molekulnya 30-45 kD, yang termasuk protease ini adalah pepsin, renin (chymosin) dan protease aspartat mikroba (Walsh, 2002).



Gambar 7. Mekanisme reaksi protease aspartat pada reaksi pemutusan ikatan peptida (Ming, 2001).

Mekanisme reaksi dari protease aspartat yang menunjukkan dua gugus aspartat yang terlibat dalam reaksi katalisis. Pada proteolisis dibutuhkan molekul air yang teraktivasi. R dan R' mewakili sisi ikatan asam amino. Gugus hidroksil terlibat pada transisi tetrahidril.

2.3.2 Aplikasi Enzim Protease

Peptidase atau protease merupakan salah satu jenis enzim yang banyak digunakan dalam berbagai bidang seperti :

a. Bidang pangan

Penggunaan enzim protease di bidang pangan seperti pada pembuatan roti, daging, dan keju. Rennet merupakan enzim golongan peptidase yang digunakan dalam mengkoagulasikan protein susu dalam pembuatan keju. Jenis peptidase lain, seperti papain dan bromelain, banyak digunakan dalam mengempukkan tekstur daging (Anonim b, 2011).

b. Bidang industri

penggunaan enzim protease dibidang industri yaitu sebagai bahan dasar pembuatan detergen dan saat ini penggunaannya lebih disukai dibandingkan dengan bahan sintesis konvensional lainnya, hal ini dapat dilihat dari kelebihanannya dalam proses pencucian, dimana enzim protease dapat digunakan pada temperatur rendah dan mengurangi bahaya akan polusi (Krik dkk, 2002).

Selain itu, Protease telah diformulasikan dalam detergen untuk memperbaiki proses pencucian dengan kemampuan menghidrolisis protein tanah yang melekat. Subtilisin Carlsberg, alkalin serin protease yang secara komersil dikenal sebagai alkalase telah digunakan sejak tahun 1960, dan optimalisasi

aktivitas protease pada kondisi pencucian yang spesifik juga telah dikembangkan (Ikeda dkk, 2002)

c. Bidang Kesehatan

Aplikasi Enzim Protease dalam bidang kesehatan adalah digunakan meniadakan atau mengurangi cairan luka, nanah dan jaringan nekrosa yang timbul pada kasus luka bakar, luka operasi, maupun jenis luka lainnya. Hal ini penting didalam proses penyembuhan dan pembersihan luka atau pengeringannya dari lapisan lendir. Dalam hal ini substrat bagi enzim adalah jaringan fibrin, lapisan mukoprotein, kolagen, dan sebagainya. Jadi protease bekerja menguraikan jaringan ini sehingga bekas luka menjadi bersih (Suhartono, 1989).

Aplikasi protease telah dilakukan oleh beberapa peneliti yang terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Aplikasi protease dari berbagai sumber

Protease dan Sumbernya	Aplikasi	Pustaka
Protease alkalin dari <i>Aspergillus clavatus</i>	Pemutih pakaian	Hajji dkk. (2007) dalam Devi dkk. (2008)
Protease serin (subtilisin Carlsberg) dari <i>Bacillus licheniformis</i>	Komposisi dari detergen yang berfungsi sebagai penghilang noda	Takagi (1992) dalam Tobe dkk. (2006)
Protease Bio-40 dari <i>Bacillus subtilis</i>	Detergen enzimatik	(Ward, 1983)