

repository.ub.ac.id

**AKTIVITAS ENZIM PROTEASE KASAR *Bacillus mycoides*
DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN PADA PERUBAHAN SUHU**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh:

AUNUS SHABUR

NIM.0610830019



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

repository.ub.ac.id

**AKTIVITAS ENZIM PROTEASE KASAR *Bacillus mycoides*
DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN PADA PERUBAHAN SUHU**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

**Oleh:
AUNUS SHABUR
NIM. 0610830019**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

LAPORAN SKRIPSI

AKTIVITAS ENZIM PROTEASE KASAR *Bacillus mycooides*
DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN PADA PERUBAHAN SUHU

Oleh:

AUNUS SHABUR

NIM. 0610830019

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

Dosen Penguji II

(Ir. TITIK DWI SULISTIYATI, MP)

NIP. 19581231 198601 2 002

Tanggal:

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Ir. DARIUS, M. Biotech)

NIP. 19500531 198103 1 003

Tanggal:

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. HARTATI K., MS)

NIP. 19640726 198903 2 004

Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

RINGKASAN

AUNUS SHABUR. Skripsi Aktivitas enzim protease kasar *Bacillus mycooides* dari ikan teri (*Stolephorus spp.*)asin terhadap perubahan suhu (di bawah bimbingan Ir. **DARIUS, M. Biotech** dan Dr. Ir. **HARTATI KARTIKANINGSIH, MS**)

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari 2012. Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mendapatkan informasi tentang aktivitas enzim protease kasar *Bacillus mycooides* dari ikan teri (*Stolephorus spp*) asin pada perubahan suhu.

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas enzim protease ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu Bakteri *B. mycooides* yang didapatkan dari hasil penelitian sebelumnya, NA (*Nutrien Agar*), kasein (PA), peptone (PA), *yeast extract* (PA), NaCl dan agar (PA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (PA), K_2HPO_4 (PA), KH_2PO_4 (PA), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PA), asam trichloroasetat (PA), L-tirosin (PA) didapatkan dari Panadia *Laboratory*, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang. HCl 0,2 N teknis, HCl 1 N teknis, HCl pekat, natrium asetat (PA), aquades, asam asetat glacial (PA), kertas saring Whatman no. 42, Tris (Hidroksi metil) amino methane (PA), kertas label, sarung tangan, aluminium foil, tissue, tali, alkohol 90%, spirtus didapatkan dari CV Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara vairabel-variabel yang diselidiki. Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian perlakuan suhu yang berbeda (20, 30, 40, 50°C) untuk mengetahui aktivitas optimum enzim protease pada suhu-suhu tersebut. Masing-masing perlakuan dilakukan 6 kali ulangan, sehingga terdapat 24 unit percobaan. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian

Berdasarkan uji statistik dengan menggunakan RAL, bahwa perlakuan suhu yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas protease. Hasil uji lanjut menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan bahwa perlakuan suhu 50°C tidak berbeda nyata. Sedangkan pada suhu 20°C, 30°C dan 40°C memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap aktivitas protease. Hal ini memperjelas bahwa suhu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas protease.

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa perlakuan terbaik suhu yang berbeda adalah pada suhu 40°C dengan rata-rata aktivitas protease sebesar 5,140 µg/ml/menit. Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim.

Dari hasil penelitian ini maka perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang pemurnian enzim protease dari bakteri *Bacillus mycooides* yang mempunyai potensi tinggi karena kebutuhan terhadap enzim protease masih cukup tinggi di masyarakat khususnya dibidang industri.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas berkah dan rahmat-Nya, penulis bisa menyelesaikan Laporan Skripsi ini. Laporan Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Ir. Darius, M. Biotech selaku dosen pembimbing I Skripsi atas segala petunjuk, kesabaran dan bimbingan mulai penyusunan usulan Skripsi sampai dengan selesainya laporan Skripsi.
2. Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen pembimbing II Skripsi atas segala petunjuk, kesabaran dan bimbingan mulai penyusunan usulan Skripsi sampai dengan selesainya laporan Skripsi.
3. Ibu Iwin Zunairoh, Mba Titik LSIH, Ibu Fitri Fakultas Kedokteran terima kasih banyak untuk bantuannya sehingga semua bisa berjalan dengan lancar.

Penulis menyadari laporan ini jauh dari kesempurnaan. Karena itu penulis mengharapkan saran-saran yang membangun dari pembaca. Harapan kami, semoga laporan ini bisa bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, Juni 2012

Penulis

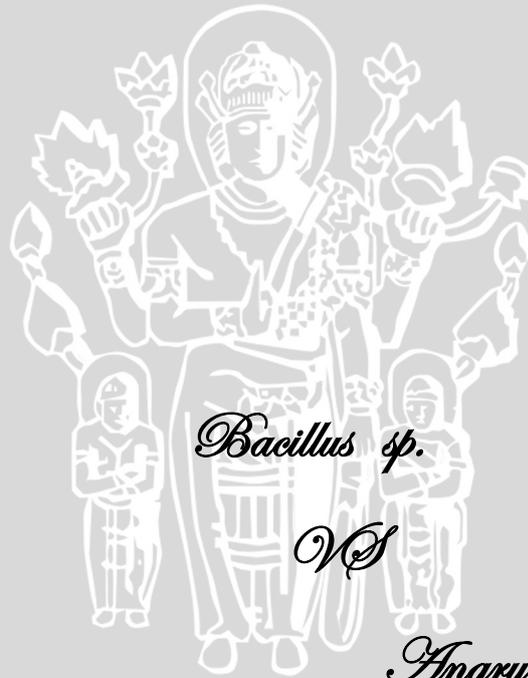
Persembahkan

- ✚ *Terima Kasih Kepada Kedua Orang Tuaku Yang Tiada Hentinya Mendoakan dan Memberikan Dukungan, Semangat Maupun Materi Demi Kelancaran Studi Putranya.*
- ✚ *Tim Bacillus sp. Yang Tak Kenal Menyerah Dalam Menyelesaikan Skripsi Ini... Bacillus Tidak Akan Menyerah Melawan Angry Bird..*
- ✚ *Sahabat-Sahabatku TAP'06 Kekompakan Kalian Merupakan Motivasi Buatku .*
- ✚ *Buat Penghuni Kost Hj. Sarah 207, Terima Kasih Atas Dukungan dan Bantuan Kalian... Tetap Semangat!!!*
- ✚ *Buat Sahabat-Sahabatku Pieterwil Drembes, Jihad, Mas Afif H. Wijatmoko, Mas Abdul Mugis, Mas Baihaki, Terima Kasih Atas Semua Kebaikan Kalian...*
- ✚ *Terakhir Buat Yang Empunya Kost Summersari Gang 04 B. No. 243 (Pak Sulkan), Kost Summersari Gang 02*

*(Bu Yul), Dan Terakhir Kost Sumber Sari Gang 03 No.
207 (Bu Romlah dan Pak Rahmat)... Terima Kasih
Atas Kebaikan Dan Tumpangan Yang Diberikan Kepada
Saya.... Mohon Maaf Jikalau Selama Ini Saya Punya
Salah Kepada Bapak Dan Ibu ...*

*Semoga Kalian Tetap Diberikan Kesehatan & Rezeki Oleh
Allah SWT...*

Amin....



Bacillus sp.

WS

Angry Bird

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Kegunaan Penelitian.....	5
1.5 Hipotesis.....	5
1.6 Tempat dan Waktu.....	5

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Teri.....	6
2.2 <i>Bacillus mycoides</i>	7
2.3 Bakteri Proteolitik.....	8
2.4 Enzim Protease.....	9
2.5 Isolasi Bakteri Proteolitik.....	10
2.6 Karakterisasi Bakteri Proteolitik.....	11
2.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	12
2.7.1 Analisa Gravimetri.....	14

2.7.2	Analisa <i>Optical Density</i>	15
2.8	Pengujian Aktivitas Protease.....	15
2.9	Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	17

3. METODE PENELITIAN

3.1	Materi Penelitian	19
3.1.1	Bahan Penelitian.....	19
3.1.2	Alat Penelitian	19
3.2	Metode Penelitian	20
3.3	Prosedur Penelitian.....	20
3.3.1	Penelitian Pendahuluan.....	20
3.3.1.1	Pembuatan Kultur Stok Isolat	20
3.3.1.2	Inokulasi <i>B. mycooides</i> pada Media LB Agar	21
3.3.1.3	Kurva Pertumbuhan.....	21
3.3.1.4	Produksi <i>Crude Enzim</i>	22
3.3.2	Penelitian Utama.....	22
3.3.2.1	Perlakuan.....	22
3.3.2.2	Rancangan Percobaan.....	23
3.4	Parameter Uji.....	24
3.4.1	Pengujian Aktivitas Protease.....	24
3.4.2	Cara Penentuan Aktivitas Protease.....	24
3.4.3	Kurva Standar Tirosin.....	25
3.5	Analisis Data.....	26

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik.....	28
4.1.1	Kurva Pertumbuhan (Metode Gravimetri)	28

4.1.2 Kurva Pertumbuhan (*Optical Density*)..... 30

4.2 Hasil Analisis Aktivitas Protease Pada Perlakuan Suhu 33

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan 37

5.2 Saran 37

DAFTAR PUSTAKA..... 38

LAMPIRAN..... 41



DAFTAR TABEL

Tabel

1. Data Hasil Analisis Gravimetri dengan Kertas Saring.....	30
2. Data Hasil Analisis <i>Optical Density</i>	31
3. Aktivitas Protease <i>B. mycooides</i> Pada Perlakuan Suhu.....	34
4. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Aktivitas Protease	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar

1. Ikan Teri.....	6
2. <i>Bacillus mycooides</i>	7
3. Denah Percobaan.....	24
4. Diagram Alir Prosedur Penelitian	28
5. Kurva Pertumbuhan <i>B. mycooides</i> Metode Gravimetri.....	30
6. Kurva Pertumbuhan <i>B. mycooides</i> Metode <i>Optical Density</i>	32
7. Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>	33
8. Grafik Aktivitas Protease Pada Variasi Suhu.....	36



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Pembuatan Kultur Stok Isolat.....	42
2. Inokulasi Bakteri <i>B. mycoides</i> Pada Media LB (<i>Luria Bertani Agar</i>).	43
3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan.....	44
4. Produksi <i>Crude Enzim</i>	46
5. Analisis Aktivitas Protease	48
6. Pembuatan Larutan	50
7. Data Penelitian	53
8. Data Analisis Aktivitas Protease	57
9. Data dan Perhitungan Analisis Gravimetri.....	60



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan mempunyai perikanan laut yang cukup besar. Potensi sumber daya ikan di laut Indonesia diperkirakan mencapai 6.7 juta ton per tahun (BBPMHP, 1996). Salah satu potensi perikanan laut tersebut adalah ikan teri. Ikan teri menempati posisi penting diantara 55 spesies ikan yang memiliki nilai ekonomis setelah ikan layang, kembung, lemuru, tembang dan tongkol. Data Dirjen Perikanan menunjukkan adanya kenaikan produksi ikan teri sebesar 11.73% selama tahun 1990-1993 (Direktorat Jenderal Perikanan, 1995).

Ikan teri (*Stolephorus spp.*) adalah ikan yang termasuk ke dalam kelompok ikan pelagis kecil, yang diduga merupakan salah satu sumberdaya perikanan paling melimpah di perairan Indonesia. Sumberdaya ini merupakan sumberdaya neritik, karena penyebarannya terutama adalah di perairan dekat pantai. Pada wilayah dimana terjadi proses penaikan massa air (*upwelling*), sumberdaya ini dapat membentuk biomassa yang besar Resmiati, *et. al.*, (2003).

Ikan teri termasuk jenis ikan yang rentan terhadap kerusakan (pembusukan), apabila dibiarkan cukup lama akan mengalami perubahan akibat pengaruh fisik, kimiawi dan mikrobiologi. Oleh karena itu, ikan teri yang sudah ditangkap harus segera mendapat proses pengolahan, diantaranya melalui pengawetan. Salah satu proses pengawetan terhadap ikan teri ini adalah melalui pengasinan. Menurut Resmiati, *et. al.*, (2003), pengasinan adalah suatu proses pengolahan ikan teri dengan cara memberikan garam sehingga mempunyai kandungan garam sangat tinggi (NaCl yang jenuh pada fase masih mengandung air) yang kemudian dikeringkan. Cara pengolahan tersebut telah lama dilakukan untuk beraneka ragam spesies ikan.

Ikan teri asin merupakan salah satu jenis makanan yang diolah dan diawetkan dengan menggunakan konsentrasi garam yang relatif tinggi sehingga optimal untuk pertumbuhan bakteri halofilik (Buckle *et. al.*, 1987). Pada ikan teri asin yang memiliki kandungan protein tinggi maka berdasarkan pengelompokan karakterisasi bakteri berdasarkan sifat pertumbuhannya pada makanan merupakan bakteri proteolitik.

Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar sel. Semua bakteri mempunyai enzim proteinase di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim proteinase ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat dibedakan atas beberapa kelompok yaitu: bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang tidak membentuk spora misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*, bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang membentuk spora misalnya *Bacillus*, dan bakteri anaerobik pembentuk spora misalnya sebagian *Clostridium* (Fardiaz, 1992).

Enzim proteolitik (protease) adalah enzim yang dapat menguraikan atau memecah protein. Berdasarkan lokasi protein yang diuraikannya enzim ini dibagi dalam dua kelompok besar yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Sedangkan berdasarkan sifat-sifat kimia dari lokasi aktif enzim protease dibagi menjadi empat golongan besar yaitu: enzim protease serin, sulfhidril, metal, dan asam (Darwis and Sukara, 1990).

Karakterisasi dan fungsi enzim adalah sebagai biokatalisator reaksi kimia. Laju reaksi dipengaruhi oleh berbagai faktor. Pengaruh berbagai kondisi pada laju reaksi disebabkan terutama mekanisme reaksi itu sendiri. Pembelajaran kinetika harus diikuti dengan hubungan antara kimia dan struktur enzim untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas proses apa yang terjadi. Namun hal ini hanya akan diperoleh dengan menggunakan enzim tingkat kemurnian yang

tinggi. Tetapi banyak enzim tidak perlu dimurnikan sedemikian rupa untuk dapat dipelajari kinetika dan karakterisasinya dengan beberapa pendekatan (Darwis,1990). Pendekatan dari sistem biologis, khususnya kehidupan sel, terdapat berbagai kondisi lingkungan yang sensitif, misalnya perubahan suhu dan pH. Hal ini menyebabkan sifat setiap enzim sangat tergantung pada kondisi sistem tersebut.

Aktivitas enzim proteolitik *B. mycoides* dari ikan teri asin yang termasuk bakteri halofilik dalam makanan yang diasinkan merupakan indikator pencemar yang menandakan terjadinya pembusukan yang terjadi karena adanya aktivitas enzimatik seperti amilase dan protease yang mendegradasi bahan makanan yang diasinkan (Ventosa dan Oren. 1995). Namun penelitian tentang karakterisasi aktivitas enzim dari bakteri halofilik yang tumbuh pada isolasi ikan teri asin masih belum terlalu banyak dilakukan di Indonesia.

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *B. mycoides* karena bakteri ini merupakan bakteri yang sering terdapat pada produk-produk hasil perikanan. Bakteri ini didapatkan dari penelitian sebelumnya tentang isolasi bakteri proteolitik dari ikan teri asin yang dilakukan oleh Apsari (2011). Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian selanjutnya tentang aktivitas enzim protease *B. mycoides* yang diisolasi dari ikan teri asin dengan perlakuan suhu yang berbeda untuk mendapatkan suhu optimum enzim tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Bacillus mycoides merupakan mikroba yang dapat memproduksi enzim, karena mikroba jenis *Bacillus* ini tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstrasel membuat

Bacillus merupakan organisme favorit untuk industri. Susanti, (2003). Bakteri ini merupakan bakteri halofilik yang dapat tumbuh dilingkungan berkadar garam tinggi dan kebutuhan nutrisinya yang sederhana membuatnya memiliki potensi yang tinggi untuk dimanfaatkan. Penelitian Apsari (2011) memperoleh isolat bakteri proteolitik pada ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin dengan sifat tahan terhadap lingkungan berkadar garam tinggi.

Untuk itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang bagaimanakah aktivitas enzim protease kasar *B. mycooides* dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin pada perubahan suhu?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah:

1. Untuk mendapatkan kurva pertumbuhan *B. mycooides*
2. Untuk mendapatkan aktivitas optimum enzim protease kasar *B. mycooides* dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin pada perubahan suhu.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan:

1. Sebagai sumber informasi kepada masyarakat tentang uji aktivitas enzim protease meliputi penentuan suhu optimum.
2. Sebagai sumber informasi bagi penelitian selanjutnya.

1.5 Hipotesis

Terdapat pengaruh antara perlakuan suhu yang berbeda terhadap aktivitas enzim protease.

1.6 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari 2012.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Teri



Gambar 1. Ikan Teri (*Stolephorus spp.*) Smallcrab, (2009).

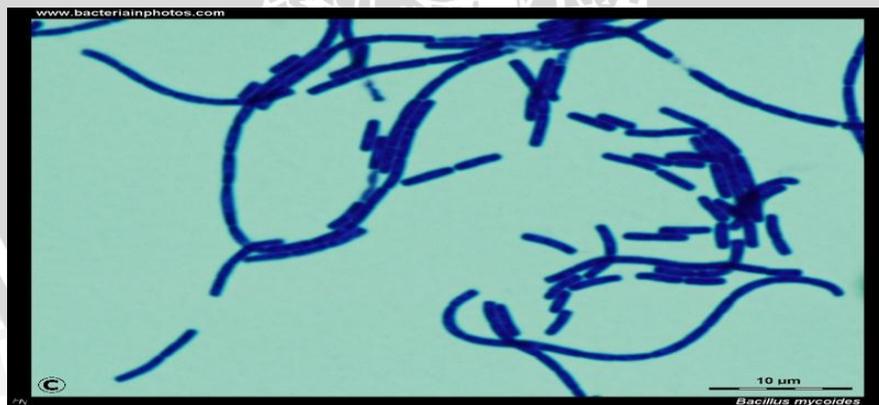
Ikan teri atau ikan bilis adalah sekelompok ikan laut kecil anggota keluarga *Engraulidae*. Nama ini mencakup berbagai ikan dengan warna tubuh perak kehijauan atau kebiruan. Walaupun anggota *Engraulidae* ada yang memiliki panjang maksimum 23 cm, nama ikan teri biasanya diberikan bagi ikan dengan panjang maksimum 5 cm. Moncongnya tumpul dengan gigi yang kecil dan tajam pada kedua-dua rahangnya. Mangsa utama ikan teri ialah plankton (Wikipedia, 2009). Klasifikasi Ikan teri adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Hewan
Filum	: Chordata
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Clupeiformes
Famili	: Engraulidae
Spesies	: <i>Stolephorus spp.</i> (Wikipedia, 2009).

Ikan teri masuk dalam family *Engraulidae* dengan nama ilmiah *Stolephorus spp.* Deskripsinya adalah sebagai berikut: a. Badan seperti cerutu,

sedikit silindris, b. Bagian perut membulat, c. Kepala pendek, d. Moncong nampak jelas dan meruncing, e. Anal sirip dubur sedikit ke belakang, f. Duri-duri lemah sirip punggung, g. Warna pucat bila sisik terlepas, h. Jenis pelagis pantai. Ikan ini ada beberapa spesies yaitu *Stolephorus commersonii*, *Stolephorus heterolobus*, *Stolephorus indicus*, *Stolephorus pseudoheterolobus*, dan *Stolephorus tri*. Nama lokal dari ikan-ikan tersebut adalah: a. *Stolephorus commersonii* nama lokalnya Teri (Jawa), Bilis (Jakarta), Eha (Wahai), Akalae (Luhu), Puri mera (Haria), b. *Stolephorus heterolobus* nama lokalnya Bilis atau Teri (Jakarta), Bandung (Kenaren), Madura (Kendui), Ambon (Ainama), c. *Stolephorus indicus*, d. *Stolephorus pseudoheterolobus* nama lokalnya Makassar (Mairo), Bajo (Lureh), Muna (Lenta/Wina), Buton (Wawokia), Wahai (Kepe), Ambon (Osmoteng), dan e. *Stolephorus tri* nama lokalnya Jawa (Teri), Jakarta (Bilis atau teri) Sumber (Definisi dan klasifikasi Statistik penangkapan perikanan laut DKP dan *Local common names of Indonesia fishes*) (La Anas, 2008).

2.2 *Bacillus mycoides*



Gambar 2. *Bacillus mycoides* (Wikipedia, 2010)

Bacillus mycoides merupakan bakteri berbentuk rantai, motil, dan dapat membentuk asam dari glukosa. Sel tubuhnya memiliki ukuran sepanjang 3 μm . Uji identifikasi dengan menggunakan metode Vosges-Prostkauer, *Bacillus*

mycoides menghasilkan enzim yang mereduksi nitrat dan methylen blue. *Bacillus mycoides* adalah bakteri yang memproduksi endospora dalam siklus hidupnya. Endospora merupakan bentuk dorman dari sel vegetatif, sehingga metabolismenya bersifat inaktif dan mampu bertahan dalam tekanan fisik dan kimia seperti panas, kering, dingin, radiasi dan bahan kimia. Tujuan dilakukannya pewarnaan endospora adalah membedakan endospora dengan sel vegetatif, sehingga pembedaannya tampak jelas. Endospora tetap dapat dilihat di bawah mikroskop meskipun tanpa pewarnaan dan tampak sebagai bulatan transparan dan sangat refraktil. Namun jika dengan pewarnaan sederhana, endospora sulit dibedakan dengan badan inklusi (kedua-duanya transparan, sel vegetatif berwarna), sehingga diperlukan teknik pewarnaan endospora (Itis, 2008).

2.3 Bakteri Proteolitik

Mikroba memiliki peran penting sebagai penghasil protease karena memiliki beberapa keunggulan antara lain, mikroba memiliki siklus hidup yang singkat, efisiensi waktu dan tempat, produktivitas tinggi dan memudahkan kita untuk melakukan manipulasi genetik (melalui rekayasa genetika mikroba) maupun manipulasi dalam proses fermentasi (rekayasa bioproses). Mikroba yang telah dikembangkan secara komersial sebagai penghasil protease antara lain *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Aspergillus oryzae*, dan *Aspergillus niger* (Putranto, 2006).

Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim proteinase di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim proteinase ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat dibedakan atas beberapa kelompok yaitu: bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang tidak membentuk spora misalnya

Pseudomonas dan *Proteus*, bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang membentuk spora misalnya *Bacillus*, dan bakteri anaerobik pembentuk spora misalnya sebagian *Clostridium* (Fardiaz, 1992). Genus-genus mikroba penghasil proteolitik meliputi *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, berbagai jamur dan khamir (Hidayat, et. al., 2006).

2.4 Enzim Protease

Enzim merupakan katalisator yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologi. Sebagai protein, enzim memiliki sifat-sifat umum protein, seperti enzim terdenaturasi pada suhu tinggi atau kondisi ekstrim lainnya. Beberapa oksidator, keadaan polaritas larutan, tekanan osmotik yang abnormal juga dapat menghambat kerja enzim (Suhartono, 1989). Enzim memiliki kelebihan terhadap katalisator non-biologis pada kecepatan serta spesifikasi terhadap substrat yang tinggi. Radzicka dan Wolfenden, (1995) dalam Pakpahan, (2009).

Protease merupakan enzim-enzim yang sangat kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersil. Protease ekstraseluler sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik intraseluler memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Seperti mengganti protein, memelihara keseimbangan antara degradasi dan sintesis protein (Kalisz, 1998). Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti, 2002).

Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease dibatasi oleh tersedianya tanah untuk penanaman dan kondisi yang cocok untuk pertumbuhan. Disamping itu proses produksi protease dari tumbuhan sangat memakan waktu. Protease tumbuhan yang dikenal antara lain papain, bromelain, dan keratinase. Protease hewan yang paling dikenal adalah tripsin, kimotripsin, pepsin dan rennin. Enzim-enzim ini dapat diperoleh dalam keadaan murni dengan jumlah besar (Boyer, 1971) dalam Pakpahan, (2009).

2.5 Isolasi Bakteri Proteolitik

Isolasi bakteri proteolitik dapat dilakukan menggunakan media *skim milk agar* (SMA). Kasein terhidrolisa dalam *skim milk agar* yang keruh digunakan untuk menentukan proteolisis oleh mikroorganisme pada atau dalam cawan agar. Koloni bakteri proteolitik akan mengelilingi areal bening sebagai hasil dari konversi kasein menjadi komponen larutan nitrogen. Bagaimanapun juga, areal bening pada *milk agar* dapat dilakukan oleh bakteri yang menghasilkan asam dari karbohidrat terfermentasi. Areal bening pada *milk agar* biasanya hanya mencerminkan pemecahan kasein yang lebih lengkap, karena tahapan awal proteolisis tidak dapat diketahui pada latar belakang yang keruh. Penegasan proteolisis, pengendap kimiawi protein (larutan asam cair) ditambahkan pada permukaan agar untuk mempercepat beberapa protein yang tidak tercerna. Peningkatan *skim milk agar* dikembangkan dengan penambahan sodium kasein, trisodium citrate, dan kalsium klorida untuk standar metode agar. Sensitivitasnya yang bertambah berhubungan dengan deteksi pada langkah awal pemecahan

kasein, pembentukan areal endapan (para kasein tak terlarut) dalam media transparan (Downes dan Ito, 2001).

Kebanyakan bakteri dapat memecah protein menjadi peptida dan asam-asam amino, dan menggunakannya untuk sumber energi atau untuk sintesis protein kembali. Untuk mengisolasi bakteri proteolitik digunakan medium yang mengandung kasein, yaitu *skim milk agar*. Pertumbuhan koloni mikroba yang memecah protein (bersifat proteolitik) pada *skim milk agar* akan dikelilingi areal bening. Untuk membedakan antara areal bening yang disebabkan oleh koloni pembentuk asam dengan koloni proteolitik, di atas medium ditambahkan HCl 1% atau asam asetat 10%. Areal di sekeliling koloni proteolitik akan tetap bening, sedangkan areal di sekeliling koloni pembentuk asam akan keruh kembali karena terjadinya koagulasi kasein oleh asam (Fardiaz, 1993).

2. 6 Karakterisasi Bakteri Proteolitik

Menurut Rao, *et. al.*, (1998) dalam Fatimah, (2005), karakterisasi bertujuan untuk menentukan suhu dan pH optimum, ketahanan terhadap panas dan pH, serta pengaruh penambahan senyawa kation dan penghambat bakteri proteolitik. Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara penumbuhan bakteri pada berbagai pH. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara penumbuhan bakteri pada berbagai suhu inkubasi.

Beberapa isolat yang memiliki nilai aktivitas hidrolisis yang tinggi dikarakterisasi sifat morfologi dan biokimianya. Karakterisasi sifat morfologi mencakup bentuk sel, mortalitas dan sifat Gram. Mortalitas diamati dengan menggunakan medium semi padat *Sulfide Indole Motily (SIM)*. Pewarnaan Gram menggunakan pewarna Kristal violet dan safranin untuk menentukan sifat Gram. Sifat biokimia yang diamati mencakup uji sitrat dengan media *Simons Citrat Agar (SCA)*, uji gelatin dengan media nutrient gelatin, dan uji katalase dengan

menggunakan larutan 3% H₂O₂. Cappuccino dan Sherman, (1983) dalam Pakpahan, (2009).

Bakteri dengan tipe berbeda memiliki kebutuhan yang jelas berbeda seperti pada suhu berapa mereka akan tumbuh. Diantara suhu maksimum, ke atas yang mana kultur akan tidak berkembang, dan suhu minimum, ke bawah yang mana kultur akan tidak berkembang, adalah jarak dimana pertumbuhan akan tampak. Pertumbuhan terbaik agak berada dalam jarak terbatas yang disebut suhu optimum. Suhu optimum bagi pertumbuhan spesies mikroba adalah hubungan terbaik dengan suhu habitat asli organisme (Seeley dan Vandemark, 1962).

Salah satu bentuk dari media selektif adalah yang mana pH medianya telah dimodifikasi sehingga sesuai hanya untuk pertumbuhan spesies toleran asam atau toleran basa. Misalnya, kapang, khamir, dan *Lactobacillus* adalah organisme yang toleran terhadap asam dan dapat tumbuh dalam media pada pH 4-5, sedangkan organisme yang tahan sedikit asam tidak mampu tumbuh. Pada suatu saat, penting bagi laboratorium mikrobiologi untuk mempersiapkan tidak hanya media kultur, tetapi juga unsur pokoknya. Pada saat sekarang dimungkinkan untuk memberikan keduanya baik media terpilih dan kultur media lengkap dalam bentuk terdehidrasi. Media terdehidrasi dilarutkan dalam air yang telah ditentukan konsentrasinya dan disterilisasi. Media akan memiliki komposisi dan pH yang tepat (Hurrigan dan Margaret, 1976).

2.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan adalah penambahan secara teratur semua komponen sel suatu jasad. Pembelahan sel adalah hasil dari pembelahan sel. Pada jasad bersel tunggal (uniseluler), pembelahan atau perbanyakan sel merupakan

pertambahan jumlah individu. Misalnya pembelahan sel pada bakteri akan menghasilkan pertambahan jumlah sel bakteri itu sendiri. Pada jasad bersel banyak (multiseluler), pembelahan sel tidak menghasilkan pertambahan jumlah individunya, tetapi hanya merupakan pembentukan jaringan atau bertambah besar jasadnya. Dalam membahas pertumbuhan mikroba harus dibedakan antara pertumbuhan masing-masing individu sel dan pertumbuhan kelompok sel atau pertumbuhan populasi.

Pertumbuhan dapat diamati dari meningkatnya jumlah sel atau massa sel (berat kering sel). Pada umumnya bakteri dapat memperbanyak diri dengan pembelahan biner, yaitu dari satu sel membelah menjadi 2 sel baru, maka pertumbuhan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel. Waktu yang diperlukan untuk membelah diri dari satu sel menjadi dua sel sempurna disebut waktu generasi. Waktu yang diperlukan oleh sejumlah sel atau massa sel menjadi dua kali jumlah/massa sel semula disebut doubling time atau waktu penggandaan. Waktu penggandaan tidak sama antara berbagai mikroba, dari beberapa menit, beberapa jam sampai beberapa hari tergantung kecepatan pertumbuhannya. Kecepatan pertumbuhan merupakan perubahan jumlah atau massa sel per unit waktu (Sumarsih, 2003).

Di dalam populasi bakteri tidak semua sel mampu terus bertahan hidup. Yang dianggap sebagai sel hidup adalah sel yang mampu membentuk koloni di dalam agar biak atau membentuk suspensi di dalam larutan biak. Sel-sel yang mampu hidup terus inilah yang dihitung dengan berbagai metode untuk menetapkan jumlah sel hidup. Kultur mikroorganisme pada lingkungan yang baru melakukan pengenalan terhadap komponen makromolekul dan mikromolekul termasuk kegiatan untuk mendapatkan pengetahuan akan sintesis atau represi enzim-enzim tertentu (Said, 1986) . Pada jumlah total sel ikut dihitung semua sel

yang nampak atau yang dapat dihitung dengan cara lain, sehingga dengan demikian sel-sel mati dan cacat ikut dihitung (Volk dan Wheeler, 1993).

Pertumbuhan mikroba biasanya ditentukan oleh waktu yang diperlukan untuk menggandakan massa sel. Waktu penggandaan massa sel dapat berbeda dengan waktu penggandaan jumlah karena massa sel dapat meningkat tanpa penambahan jumlah sel. Untuk mengukur pertumbuhan mikrobial dapat digunakan berbagai metode. Tetapi tidak satu pun prosedur yang dapat diaplikasikan pada semua situasi. Dalam banyak kasus, khususnya yang menyangkut fermentasi komersial maka media untuk pertumbuhan dan perkembangan produk sangat kompleks sehingga metode langsung untuk mengestimasi massa sel atau banyaknya sel tidak dapat digunakan dan cara yang diperlukan adalah cara yang tidak langsung (Judoamidjojo *et. al.*, 1990).

Kurva pertumbuhan diawali dengan fase awal (lag) yang merupakan masa penyesuaian mikroba. Pada fase tersebut terjadi sintesis enzim oleh sel yang dipergunakan untuk metabolisme metabolit. Setelah fase awal selesai, baru mulai terjadi reproduksi selular. Konsentrasi selular meningkat, mula-mula perlahan kemudian makin lama makin meningkat sampai pada suatu saat laju pertumbuhan atau reproduksi seluler mencapai titik maksimal dan terjadi pertumbuhan secara logaritmik atau eksponensial (Putranto, 2006). Fase logaritmik dicirikan dengan suatu garis lurus pada plot antara \ln berat kering terhadap waktu. Periode eksponensial merupakan periode pertumbuhan mikroorganisme yang stabil dengan laju pertumbuhan spesifik, (μ) konstan (Panji *et. al.*, 2002).

2.7.1 Analisis Gravimetri

Analisis gravimetri ini menggunakan metode kertas saring. Analisis Gravimetric adalah suatu bentuk analisis kuantitatif yang berupa penimbangan, yaitu suatu proses pemisahan dan penimbangan suatu komponen dalam suatu zat dengan jumlah tertentu dan dalam keadaan sempurna mungkin. Kepekaan analisa gravimetri, lebih ditentukan oleh kesulitan untuk memisahkan endapan yang hanya sedikit dari larutan yang cukup besar volumenya. Kekhususan cara gravimetri, pereaksi gravimetri yang khas (spesifik) bahkan hampir semua selektif dalam arti mengendapkan sekelompok ion.

Metode dalam Analisis Gravimetri yaitu metode pengendapan, metode penguapan, metode elektrolisis. Pada penelitian ini menggunakan metode pengendapan, metode ini pembentukan endapannya dibedakan menjadi 2 macam yaitu endapan dibentuk dengan reaksi antar analit dengan suatu pereaksi, biasanya berupa senyawa baik kation maupun anion. Pengendapan dapat berupa anorganik maupun organik. Kemudian endapan dibentuk cara elektrokimia (analit dielektrolisa), sehingga terjadi logam sebagai endapan dengan sendiri kation diendapkan.

Prinsip dasar Metode gravimetri yaitu untuk analisa kuantitatif didasarkan pada stokiometri reaksi pengendapan, gravimetri metode pengendapan ini menggunakan pereaksi yang akan menghasilkan endapan dengan zat yang dianalisa sehingga mudah di pisahkan dengan cara penyaringan.

2.7.2 Analisis Optical Dencity

Analisis optical dencity ini menggunakan metode spektrofotometer. Salah satu contoh instrumentasi analisis yang lebih kompleks adalah spektrofotometer UV-Vis. Alat ini banyak bermanfaat untuk penentuan konsentrasi senyawa-senyawa yang dapat menyerap radiasi pada daerah ultraviolet (200 – 400 nm)

atau daerah sinar tampak (400 – 800 nm) (Anonymous, 2011). Analisis ini dapat digunakan yakni dengan penentuan absorbansi dari larutan sampel yang diukur. Prinsip penentuan spektrofotometer UV-Vis adalah aplikasi dari Hukum Lambert-Beer, yaitu:

$$A = -\log T = -\log I_t / I_0 = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Dimana : A = Absorbansi dari sampel yang akan diukur

T = Transmittansi

I₀ = Intensitas sinar masuk

I_t = Intensitas sinar yang diteruskan

ε = Koefisien ekstingsi

b = Tebal kuvet yang digunakan

C = Konsentrasi dari sampel

2.8 Pengujian Aktivitas Protease

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan variasi suhu optimum. Variasi suhu dilakukan saat inkubasi kasein oleh enzim protease dimana enzim yang digunakan merupakan ekstrak liofilisasi. Variasi yang digunakan adalah 20°C, 30°C, 40°C dan 50°C, aktivitas ekstrak kasar enzim ini diuji dengan menggunakan metode Nakanashi (1974), Metode ini menggunakan casein sebagai substrat (Kosim dan Putra, 2010).

Menurut Palaniswamy (2008), Aktivitas optimum dari protease yang dihasilkan dari fungi strain *Aspergillus niger* seperti yang dilaporkannya mencapai 89 U/mL pada suhu 45°C, Aktivitas yang tinggi ini disebabkan perolehan enzim ekstraseluler yang diisolasi dari fungi lebih tinggi dibandingkan dari mikroba lainnya. Pemisahan enzim dari miselium fungi dapat dilakukan dengan penyaringan sederhana, sementara dari mikroba lainnya seperti bakteri dilakukan dengan sentrifugasi.

Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Hal ini disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat (Kosim dan Putra, 2010).

Pengukuran aktivitas protease ini menggunakan metode Bregmeyer dan Grasal (1983). Prinsip kerja dari metode ini yaitu kasein yang berfungsi sebagai substrat akan dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino.

Kasein → Peptida + asam amino

Laju pembentukan peptida dan asam amino tersebut dapat dijadikan tolak ukur aktivitas katalis protease. Asam-asam amino yang terbentuk harus dipisahkan ini dilakukan dengan penambahan TCA. Penambahan TCA ini sekaligus menginaktifkan enzim protease (Sumarlin, 2010).

2.9 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Semua enzim adalah protein, dan aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim seperti protein lain, mempunyai berat molekul berkisar dari kira-kira 12.000 sampai 1 juta. Oleh karena itu enzim berukuran amat besar dibandingkan dengan substrata tau gugus fungsional targetnya.

Penataan tertentu pada rantai samping asam amino suatu enzim di sisi aktifnya menentukan tipe molekul yang dapat terikat dan bereaksi disitu.

Biasanya ada sekitar lima rantai samping seperti itu dalam enzim apapun. Selain itu, banyak enzim yang molekul-molekul non protein kecil yang terhubung dengan sisi aktif atau didekatnya. Molekul-molekul ini disebut kofaktor atau koenzim (Ngili, 2009). Beberapa enzim memerlukan kofaktor atau koenzim untuk aktivitas katalitiknya, dan enzim lain mungkin membutuhkan koenzim maupun satu atau lebih ion logam untuk aktivitas katalitiknya. Bagian holoenzim (koenzim dan ion) bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian apoenzim (protein) terdenaturasi oleh panas (Poedjadi dan Supriyanti, 1994).

Pengaruh suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisa suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Sejalan dengan meningkatnya suhu, makin meningkat pula aktivitas enzim. Secara umum, setiap peningkatan sebesar 10°C di atas suhu minimum, aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim secara structural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum ezim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada didalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein didalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1997).

Aktivitas enzim dipengaruhi pula oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin cepatnya substrat terikat pada enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik jenuh tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan laju reaksi (Pratiwi,

2008). *Facilitation of proximity*, atau kemudahan berdekatan, yang disebut sebagai efek keakraban, yang berarti bahwa laju reaksi antara dua molekul ditingkatkan bila dalam larutan encer keduanya dijaga dalam jarak dekat dalam sisi aktif enzim, sehingga menaikkan konsentrasi efek reaktan (Ngili, 2009).

pH lingkungan juga berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hydrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum dimana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hydrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1997).

Selain suhu, pH dan konsentrasi substrat, aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh ada tidaknya inhibitor. Jika terdapat pengurangan laju reaksi oleh suatu senyawa, senyawa tersebut dinamakan inhibitor. Inhibitor dapat bersaing dengan substrat dalam berikatan dengan enzim, sehingga menghalangi substrat terikat pada tapak aktif enzim (Poedjadi dan Supriyanti, 1994). Peningkatan laju reaksi yang disebabkan oleh activator adalah kebalikan dari efek inhibitor.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas enzim protease ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu Bakteri *B. mycoides* yang didapatkan dari hasil penelitian sebelumnya, NA (*Nutrien Agar*), kasein (PA), peptone (PA), *yeast extract* (PA), NaCl dan agar (PA), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (PA), K_2HPO_4 (PA), KH_2PO_4 (PA), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PA), *trichloroacetate acid* (PA), *L-tirosin* (PA) didapatkan dari Panadia Laboratory, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang. HCl 0,2 N teknis, HCl 1 N teknis, HCl pekat, natrium asetat (PA), *aquades*, asam asetat glasial (PA), kertas saring *Whatman* no. 42, Tris (hidroksi metil) *amino methane* (PA), kertas label, sarung tangan, *aluminium foil*, *tissue*, tali, alkohol 90%, spirtus didapatkan dari CV. Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam karakterisasi aktivitas enzim protease kasar ini terdiri dari, tabung reaksi (*Phyrex*), rak tabung reaksi, cawan petri, pipet volume 10 ml (*Phyrex*), bola hisap, pipet serologis (*Iwaki*), erlenmeyer (*Phyrex*) 25 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, beaker glass (*Phyrex*) 100, 250 dan 500 ml, spatula, timbangan digital merk *Mettler Toledo* dengan ketelitian 0,01 gr, nampan, *vortex mixer* merk *Barnstead*, *shaker incubator* SI-600R, sentrifuge, merk *Sartorius Sigma 3-18K* jarum ose, kompor, *sprayer*, bunsen, oven merk *Memmert*, *crushable tank*, timbangan analitik merk *Mettler Toledo*, *washing bottle*, *water bath*, *laminar air flow*, inkubator merk *Memmert*, spektrofotometer merk *Thermo Spectronic*, spektrofotometer UV-vis, micropipet merk *Avi-Teck*,

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel. Hasil yang diperoleh menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan seberapa besar hubungan sebab dan akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan. Teknik pengumpulan data dilakukan dengan observasi langsung atau dengan pengamatan secara langsung (Nazir, 1988).

Bacillus mycoides merupakan salah satu bakteri yang bersifat halofilik. Telah dilaporkan bahwa bakteri ini dapat menghasilkan enzim protease. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Berdasarkan informasi tersebut peneliti mencoba menggambarkan dan menginterpretasikan aktivitas enzim protease kasar *B. mycoides* dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin pada perubahan suhu.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

3.3.1.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat

Tahap awal adalah penumbuhan bakteri proteolitik dari ikan teri asin menggunakan metode Downes and Ito (2001). Sampel berupa bakteri *B. mycoides* didapatkan dari penelitian sebelumnya tentang karakteristik bakteri proteolitik yang diisolasi dari ikan teri asin yang dilakukan oleh Apsari (2011). Media yang digunakan adalah *Skim Milk Agar (SMA)* yang berasal dari *Nutrien Agar* ditambahkan dengan kasein. Metode yang dilakukan saat penanaman adalah metode gores secara *zig-zag* sehingga menggunakan 1 ose sampel.

Nutrien agar dan casein (10:1) dilarutkan dengan aquadest (1:5) dan NaCl sebanyak 15% dipanaskan sampai homogen. Sterilisasi yang dilakukan dengan menggunakan suhu 121°C selama 15 menit kemudian dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml, dibiarkan padat pada posisi miring. Setelah benar-benar padat kemudian media digores dengan 1 ose isolat mikroba secara aseptis dengan metode gores secara *zig-zag*. Media yang sudah berisi isolat bakteri kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Langkah-langkah dan diagram alir pembuatan kultur stok dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.1.2 Inokulasi Bakteri *B. mycooides* pada Media *Luria Bertani Agar*

Pada tahap inokulasi bakteri *B. mycooides* dalam media *Luria Bertani Agar*, pertama-tama dilakukan pembuatan media terlebih dahulu dengan melarutkan 1 gram pepton, 0,5 gram yeast ekstrak, 1 gram NaCl dan 1,5 gram agar ke dalam 100 ml *aquadest* sampai benar-benar homogen. Kemudian dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 20 ml. Setelah media dalam cawan benar-benar beku, dilakukan inokulasi bakteri *B. mycooides* sebanyak 1 ose dari kultur stok dengan cara *distreak*. Media yang sudah berisi bakteri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Langkah-langkah dan diagram alir inokulasi *B. mycooides* pada media *Luria Bertani Agar* dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.1.3 Kurva Pertumbuhan

Pada pembuatan kurva ini digunakan 2 metode perhitungan yaitu: gravimetri, dengan metode kertas saring dan *Optical Dencity* dengan metode spektrofotometer. Isolat bakteri proteolitik yang telah didapatkan dari media *Luria Bertani Agar*, diambil 1 ose kemudian diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Luria Bertani Broth* sebanyak 10 ml. Isolat tersebut kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* selama 24 jam pada suhu 37°C kecepatan

120 rpm. Diambil 1 ml kemudian diinokulasikan ke dalam 250 ml media LB *Broth* steril dan diinkubasi dalam shaker incubator pada suhu 37^o C selama 24 jam. Dilakukan pembacaan OD setiap 2 jam pada panjang gelombang 660 nm dan dibuat kurva pertumbuhan. Sisa pembacaan OD (*Optical Density*) pada kuvet dituang sebanyak 1 ml pada kertas saring *Whatman* no. 42 yang sudah dikeringkan dan diketahui berat awalnya untuk selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan menggunakan metode gravimetri.

Pada pembacaan OD dengan spektrofotometer, absorbansi yang berkisar antara 0,4-0,5 diambil sebanyak 1 ml untuk dimasukkan ke dalam media produksi. Langkah-langkah dalam pembuatan kurva pertumbuhan dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.3.1.4 Produksi *Crude Enzim* (Grata et. al., 2010)

Pada tahap produksi *crude* enzim, 1 ml starter pada absorbansi 0,4-0,5 dimasukkan ke dalam media produksi yang terdiri dari (pepton 10 g, *yeast extract* 5 g, NaCl 10 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, K₂HPO₄ 3 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g dan 1 liter *aquades*). Diinkubasi dalam *shaker incubator* 120 rpm pada suhu 37^oC selama 24 jam. Setelah masa inkubasi kemudian disentrifuge pada 4000 rpm suhu 4^oC selama 20 menit dan dibuat larutan enzim dengan menambahkan larutan diluent dengan perbandingan yang sesuai. Skema kerja produksi *crude* enzim dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.3.2 Penelitian Utama

3.3.2.1 Perlakuan

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh suhu optimum untuk mendapatkan aktivitas protease tertinggi. Hasil penelitian pendahuluan selanjutnya dijadikan dasar untuk penelitian utama dengan perlakuan suhu 20^oC, 30^oC, 40^oC dan 50^oC. Menurut Pratiwi (2008) dalam Pakpahan (2009), setiap

peningkatan suhu sebesar 10⁰C di atas suhu minimum, aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim secara structural.

3.3.2.2 Rancangan Percobaan

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk percobaan yang mempunyai media dan tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan di Laboratorium, rumah kaca, dan peternakan. Karena media Homogen maka media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model untuk RAL adalah sebagai berikut:

$$\text{Rumus model RAL : } Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} : respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : nilai tengah umum

T_i : pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} : pengaruh gallat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

(Sumber: Sastrosupadi, 2000).

Perlakuan yang diberikan adalah pemberian perlakuan suhu yang berbeda (20, 30, 40, 50⁰C) untuk mengetahui aktivitas optimum enzim protease pada suhu-suhu tersebut mengacu pada Grata *et. al.*, (2010) dan Qadar *et. al.*, (2009). Masing-masing perlakuan dilakukan 6 kali ulangan, sehingga terdapat 24 unit percobaan. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian seperti pada Gambar 3 berikut ini:

A2	B2	B3	D1	B4	C1
A3	C2	B6	B5	A4	D6
D2	A6	D5	D3	A5	B1
D4	C3	C5	A1	C4	C6

Gambar 3. Denah percobaan

3.4 Parameter Uji

Parameter uji pada penelitian ini adalah uji aktivitas protease kasar dari *B. mycoides* dengan pemberian perlakuan suhu yang berbeda (20°C, 30°C, 40°C, 50°C) untuk memperoleh aktivitas terbaik enzim atau dengan kata lain mendapatkan aktivitas optimum enzim protease tersebut.

3.4.1 Pengujian Aktivitas Protease

Pengujian aktivitas protease diawali dengan penyiapan larutan yang akan digunakan, antara lain 1). Larutan substrat. Larutkan 70 g kasein ke dalam suatu larutan yang mengandung 3,025 g (0,05 M) Tris : Tris (hidroksi metil) *amino methane*, dan 4,0 ml 1N HCl di dalam ± 250 ml *aquades*. Dipanaskan selama 30 menit pada *hot plate* sambil dilakukan pengadukan kadang-kadang. Didinginkan pada suhu kamar dan diatur pada pH 7,0 dengan menambahkan 70 ml 0,2 N HCl. Kemudian diencerkan menjadi 500 ml dengan menambahkan *aquades*. Larutan ini dapat digunakan untuk 5 hari jika disimpan di dalam lemari pendingin.

2). Diluent. Diluent dalam hal ini adalah 0,1 N Tris buffer yang mempunyai pH 7,0. Larutan ini diperoleh dengan melarutkan 12,2 g Tris ke dalam *aquades*, ditambah 90,0 ml HCl dan diencerkan kembali dengan *aquades* menjadi 1 liter.

3). TCA *reagent*. Larutkan 18,0 g asam trichloroasetat dan 19,0 g natrium asetat (3H₂O) ke dalam air, kemudian tambahkan 20 ml asam asetat glasial dan encerkan dengan *aquades* menjadi 1 liter.

4). Larutan Enzim. Ke dalam larutan

diluent ditambahkan larutan yang mengandung enzim dengan konsentrasi yang sesuai. Larutan enzim mengandung 5-22 PC unit, dengan absorbansi 0,16-0,70. Langkah-langkah pembuatan larutan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.4.2 Cara Penentuan Aktivitas Protease

Metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas protease ini mengacu pada metode yang digunakan oleh Kuswanto (1987). Dimasukkan 5 ml larutan substrat ke dalam tabung reaksi untuk setiap sampel yang akan ditera aktifitasnya, dan dibuat satu tabung untuk blanko. Mula-mula tambahkan 1 ml larutan enzim ke dalam tabung. Ke dalam blanko ditambahkan 1 ml diluent. Setelah penambahan enzim segera dilakukan pencampuran sedemikian rupa sehingga larutan substrat dan larutan enzim tercampur merata. Inkubasikan selama 6 jam dalam *shaker* inkubator pada suhu 20°C, 30°C, 40°C, 50°C dengan kecepatan 120 rpm. kemudian ditambahkan 5 ml TCA *reagent*, diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan disaring dengan kertas saring *Whatman* no.42 (11 cm). Dilakukan pengenceran 1 : 10 dengan *aquades* dan dimasukkan ke dalam inkubator selama 1 jam. Pembacaan OD (*Optical Density*) dilakukan pada panjang gelombang 275 nm dan setiap kali distandarisasi dengan blanko. Langkah-langkah penentuan aktivitas protease dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.4.3 Kurva Standart Tirosin (Kuswanto,1987)

100 mg L-*tyrosin* dilarutkan ke dalam 60 ml 0,1 N HCl. Setelah tirosin betul-betul terlarut sempurna barulah dicampurkan dengan *aquades* menjadi 1 liter. Larutan ini mengandung 100 µg tirosin/ml. siapkan 3 macam larutan yang mengandung 25, 40 dan 75 µg tirosin/ml, dan diukur masing-masing absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm. Digambar hasil pembacaan OD dan diperoleh suatu grafik garis lurus yang melalui titik pusat. Diambil nilai untuk 60 µg tirosin/ml dari grafik itu dibagi nilai itu dengan 40 sehingga diperoleh nilai absorbansinya absor 0,003117 untuk 1,50 µg tirosin/ml

Besarnya unit dalam proses pemecahan/hidrolisa yang dikatalisis oleh enzim, dalam hal ini adalah:

$$\frac{A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis}}{A \text{ 275 untuk 1,50 g tirosin/ml}} \times \frac{\text{volume}}{\text{waktu}} =$$

$$\frac{A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis}}{0,003117} \times \frac{11}{30} \times \frac{10}{3} =$$

$$A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis} \times 392.157 =$$

Unit-unit yang dihitung dengan cara ini disebut: PC unit. Besarnya PC unit per gram sampel disebut PC.

$$PC = \frac{A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis} \times 392.157}{\text{gram enzim dalam sampel}}$$

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, akan dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman ANOVA (*Analysis of Variance*) sesuai dengan rancangan yang digunakan rancangan acak lengkap (RAL). Langkah selanjutnya adalah membandingkan antara F hitung dengan F tabel:

- Jika F hitung < F tabel 5 %, maka perlakuan tidak berbeda nyata.
- Jika F hitung > F tabel 1 %, maka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata.
- Jika F tabel 5 % < F hitung < F tabel 1 %, maka perlakuan menyebabkan hasil berbeda nyata.

Kemudian menentukan varietas mana yang lebih potensial dengan mencari nilai pembandingnya seperti BNT (Beda Nyata Terkecil). BNT adalah suatu kriteria yang dapat dipakai untuk melakukan uji statistik antara sepasang harga rata-rata yang telah direncanakan (Hairuman, 2004).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain dan biasanya mengacu pada perubahan didalam hasil panen sel (pertambahan total massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Pertumbuhan menyatakan pertambahan jumlah atau massa melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *B. mycoides* ini bertujuan untuk mengetahui fase log bakteri tersebut. Bakteri yang didapat pada fase log selanjutnya akan digunakan untuk menganalisa aktivitas enzim protease pada pengaruh suhu yang berbeda. Data kurva pertumbuhan dibuat dengan cara, bakteri biakan pada media padat diinokulasi pada media cair yang digunakan sebagai kultur awal.

Kultur awal media cair ini bertujuan untuk menyeragamkan usia bakteri dari biakan padat. Kurva pertumbuhan diperoleh dengan 2 metode yaitu metode gravimetri menggunakan kertas saring, dan metode turbidimetri, yaitu melihat jumlah bakteri dengan mengukur densitas optik pada panjang gelombang 660 nm (DO_{660}) sebagai fungsi waktu dimana pengukuran dilakukan selama 24 jam dengan selang waktu 2 jam. Tujuan dari pembuatan kurva dengan dua metode yang berbeda ini adalah untuk membandingkan dan mencari hasil yang terbaik berdasarkan kurva tersebut, sehingga selanjutnya akan dilakukan isolasi protease dari fase log bakteri.

4.1.1 Kurva Pertumbuhan (Metode Gravimetri)

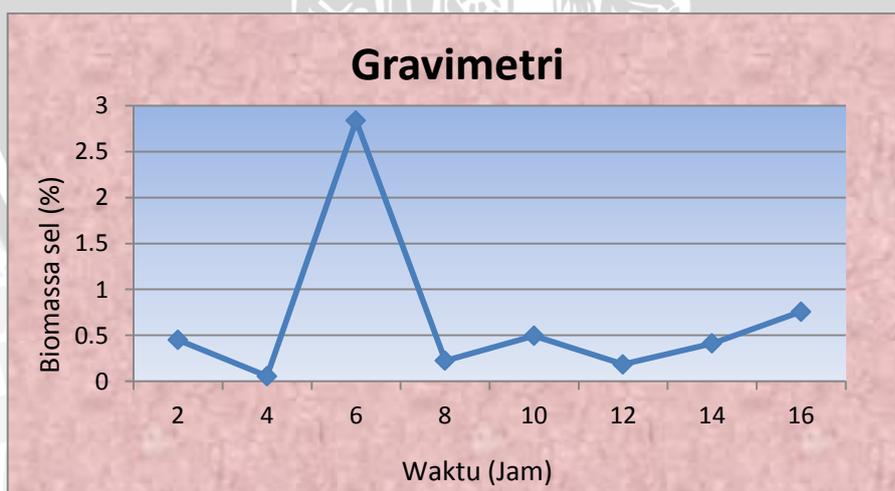
Analisis Gravimetri adalah suatu bentuk analisis kuantitatif yang berupa penimbangan, yaitu suatu proses pemisahan dan penimbangan suatu komponen dalam suatu zat dengan jumlah tertentu (Anonymous, 2011). Dalam analisis gravimetri yang dihitung adalah bagian berat dari zat yang dianalisis yang

terdapat dalam sampel. Pada analisis gravimetri ini menggunakan gravimetri cara penguapan untuk mengetahui berat biomassa sel bakteri *B. mycooides*. Berdasarkan analisis biomassa sel menggunakan metode gravimetri, diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 1. Data Hasil Analisis Gravimetri Dengan Kertas Saring

Jam	Biomassa Sel (%)
2	0,450
4	0,055
6	2,837
8	0,225
10	0,495
12	0,185
14	0,411
16	0,757

Dari data di atas dapat dilihat bahwa nilai biomassa sel tertinggi terdapat pada jam ke-6 dan dapat dikatakan sebagai titik puncak fase log sebesar 2,837%. Sedangkan pada jam ke-2 sampai jam ke-4 merupakan masa adaptasi dari bakteri *B. mycooides* sehingga dari data di atas didapatkan kurva seperti pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva Pertumbuhan Hasil Analisis Gravimetri

Dari kurva pertumbuhan *B. mycooides* pada Gambar 5, dapat dilihat bahwa *B. mycooides* melakukan adaptasi pada fase lag selama \pm 4 jam. Waktu adaptasi ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan media *starter* untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan media produksi, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen, karena transter ini hanya bertujuan untuk menghomologkan umur bakteri agar seragam.

Setelah mengalami fase adaptasi, maka bakteri akan memasuki fase log. Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya. Oleh karena itu, pada fase ini bakteri banyak memproduksi zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya. Pada penelitian ini, fase log bakteri terjadi pada jam ke-4 hingga jam ke-6 dengan biomassa sel sebesar 2,837%.

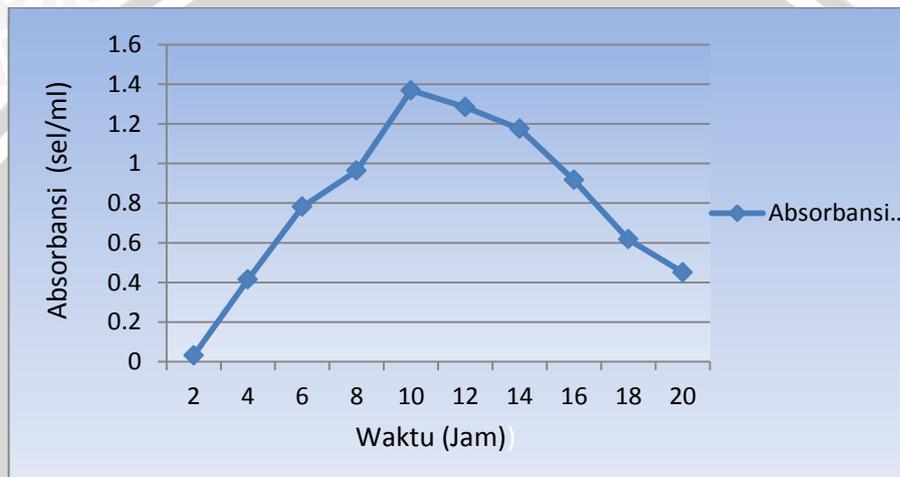
4.1.2 Kurva Pertumbuhan (*Optical Density*)

Tabel 2. Data Hasil Analisis *Optical Density* (OD)

Jam	Absorbansi (sel/ml)
2	0.032
4	0.415
6	0.782
8	0.964
10	1.369
12	1.284
14	1.175
16	0.917
18	0.618
20	0.451

Data hasil analisis menggunakan metode spektrofotometri (*Optical Density*) dapat dilihat pada Tabel 2. Tabel analisa *optical density* (OD) di atas dapat dilihat bahwa nilai tertinggi terdapat pada jam ke-10 sebesar 1,369 sel/ml

dan dikatakan sebagai titik puncak fase log pertumbuhan bakteri. Fase log ini dimulai pada jam ke-2 sampai jam ke-10 karena pada interval jam tersebut terjadi peningkatan jumlah sel. Sedangkan pada jam ke-12 sampai dengan jam ke-20 mengalami penurunan jumlah sel bakteri dan dapat dikatakan sebagai fase stasioner sampai fase menuju kematian. Dari data di atas tersebut dapat dibuat kurva seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Kurva Pertumbuhan *Bacillus mycooides*

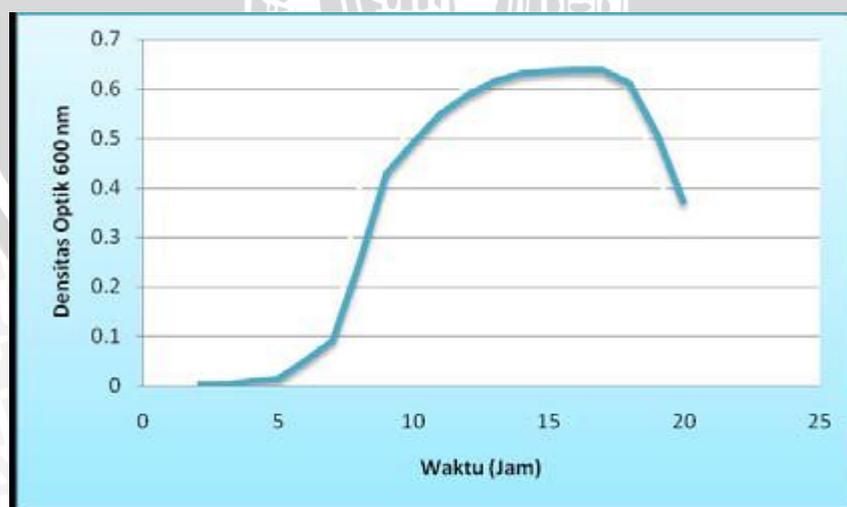
Dari kurva pertumbuhan *B. mycooides* pada Gambar 6, dapat dilihat bahwa *B. mycooides* melakukan adaptasi pada fase lag ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan media starter untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan media pertumbuhan, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen. Setelah mengalami fase adaptasi, sel mulai membelah dengan kecepatan yang sangat rendah karena baru selesai tahap penyesuaian diri. Fase ini merupakan fase pertumbuhan awal.

Setelah mengalami fase adaptasi, maka bakteri akan memasuki fase log. Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya. Pada penelitian ini, fase log terjadi terjadi

pada jam ke-2 hingga jam ke 10 dengan nilai absorbansi tertinggi adalah 1,369 sel/ml. Oleh karena itu, dilakukan isolasi pada jam ke-5 sebagai pertengahan fase log bakteri.

Pada jam ke-12 kerapatan optik mulai menurun. Pada fase ini bakteri bakteri memasuki fase kematian. Kematian ini terjadi karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah tertimbun dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya. Dari kurva pertumbuhan di atas tidak terdapat fase stasioner atau fase pertumbuhan statis, itu lebih dikarenakan interval waktu yang digunakan cukup lama yaitu selang waktu 2 jam sehingga fase stasioner tidak tergambar.

Pengamatan terhadap kurva pertumbuhan juga telah dilakukan oleh Kosim and Putra (2009), dimana fase log dimulai pada jam ke-5 hingga jam ke-13. Perbedaan yang signifikan terdapat pada rentang densitas optik antara 0-0,7 sedangkan pada penelitian ini berkisar antara 0-1,6. Hal ini terjadi karena medium yang digunakan oleh Kosim dan Putra (2010) berbeda dengan medium yang digunakan pada penelitian ini. Perbedaan ini dapat dilihat pada data densitas optik pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva Pertumbuhan *B. subtilis* (Kosim dan Putra, 2009)

Dari kedua metode yang digunakan yaitu metode gravimetri menggunakan kertas saring dan metode spektrofotometri (*Optical Density*) didapatkan data terbaik dengan menggunakan metode spektrofotometri yaitu melihat jumlah bakteri dengan mengukur densitas optik pada panjang gelombang 660 nm (DO_{660}) sesuai dengan pengamatan kurva pertumbuhan bakteri *B. subtilis* yang telah dilakukan oleh Kosim and Putra (2010).

4.2. Hasil Analisis Aktivitas Protease Pada Perlakuan Suhu

Analisa yang dilakukan pada perlakuan suhu ini menggunakan empat suhu yang berbeda yaitu 20°C, 30°C, 40°C, 50°C dengan 6 kali pengulangan. Data hasil analisis perlakuan suhu dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 8.

Tabel 3. Aktivitas Protease *B. mycooides* pada Perlakuan Suhu ($\mu\text{g/ml/menit}$)

Perlakuan	Ulangan						Total	Rerata	STD
	1	2	3	4	5	6			
A (Suhu 20°C)	4.489	4.854	4.321	4.596	4.947	4.857	28.064	4.677	0.247
B (Suhu 30°C)	5.069	4.916	5.093	5.084	4.916	4.949	30.026	5.004	0.086
C (Suhu 40°C)	5.167	4.957	5.182	5.162	5.205	5.164	30.838	5.140	0.091
D (Suhu 50°C)	5.100	5.127	5.067	5.175	5.119	4.875	30.464	5.077	0.105
							119.393		

Pada Tabel 3 tersebut dapat dilihat bahwa perlakuan C (Suhu 40°C) memiliki nilai rata-rata aktivitas protease terbesar bila dibandingkan dengan perlakuan yang lain yaitu sebesar 5,140 $\mu\text{g/ml/menit}$. Hal ini disebabkan karena suhu 40°C tidak jauh berbeda dengan suhu optimum enzim pada lingkungannya yaitu sekitar 37°C. Berbeda dengan pengamatan yang dilakukan oleh (Grata *et al.*,2010) yang melakukan pengamatan terhadap aktivitas protease dari *B.*

mycoides A 134 dengan menggunakan medium kasein memiliki nilai aktivitas protease terbesar pada perlakuan suhu 60°C (11,44 µmol). Reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan meningkat seiring dengan kenaikan suhu 0 – 35°C. Secara umum kenaikan 10°C maka kecepatan reaksi menjadi dua kali lipatnya dalam batas suhu yang wajar. Suhu ideal kerja enzim adalah 30 – 40°C, dengan suhu optimum 36°C. Di bawah atau di atas suhu tersebut kerja enzim lemah bahkan mengalami kerusakan. Enzim akan menggumpal (denaturasi) dan hilang kemampuan katalisisnya jika dipanaskan (Al-Hikmah, 2010). Data pada Tabel 4 tersebut dianalisis menggunakan MINITAB 14 dan menunjukkan data menyebar normal (Lampiran 7). Data aktivitas protease *B. mycoides* disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 8. Untuk mengetahui apakah perlakuan suhu yang berbeda benar-benar berpengaruh terhadap hasil penelitian, maka dilakukan analisis statistik.

Setelah dilakukan perhitungan statistik terhadap data aktivitas protease, diperoleh hasil analisis sidik ragam, dimana (F hitung $>$ F 5%) yang dapat diartikan bahwa perlakuan suhu yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas protease. Untuk mengetahui urutan pengaruh perlakuan yang berbeda, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Aktivitas Protease

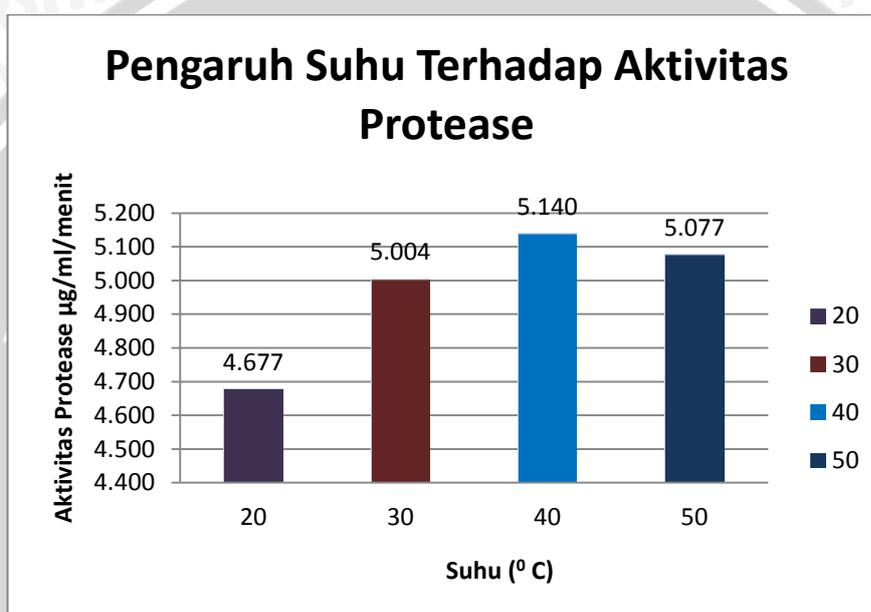
Perlakuan	Rata-rata	Notasi BNT _{0,05}
A (Suhu 20°C)	4,677	a
B (Suhu 30°C)	5,004	b
C (Suhu 40°C)	5,140	c
D (Suhu 50°C)	5,077	bc

Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata

Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata

Berdasarkan Tabel uji BNT di atas dapat diketahui bahwa perlakuan suhu 50°C tidak berbeda nyata. Sedangkan pada suhu 20°C, 30°C dan 40°C memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap aktivitas protease. Hal ini memperjelas bahwa suhu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas protease, dimana terjadinya peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan aktivitas enzim.

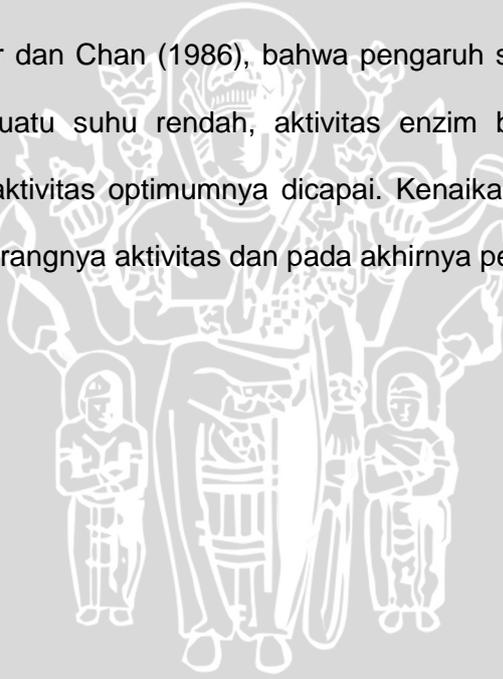


Gambar 8. Grafik Aktivitas Protease Pada Variasi Suhu

Dari grafik pengaruh suhu dengan aktivitas protease pada Gambar 8, pemberian perlakuan suhu yang berbeda memberikan pengaruh terhadap aktivitas protease. Peningkatan aktivitas enzim protease terlihat pada suhu 20°C sampai 40°C, namun pada suhu 50°C terjadi penurunan. Penurunan aktivitas protease ini disebabkan karena peningkatan suhu melebihi suhu optimum menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi enzim atau terjadinya perubahan konformasi enzim sehingga substrat sulit untuk memasuki sisi aktif enzim. Menurut Kosim dan Putra (2010), peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Peningkatan suhu sampai pada suhu optimum menyebabkan pembentukan kompleks enzim-substrat menjadi lebih singkat karena terjadi

kesesuaian antara Hal ini disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk semakin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat semakin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim

Menurut Pelczar dan Chan (1986), bahwa pengaruh suhu pada aktivitas enzim dimulai pada suatu suhu rendah, aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai aktivitas optimumnya dicapai. Kenaikan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas dan pada akhirnya merusak enzim.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai aktivitas enzim protease kasar *B. mycooides* dari ikan teri (*stolephorus spp*) asin pada perubahan suhu dapat disimpulkan bahwa:

- Berdasarkan hasil pada penentuan kurva pertumbuhannya, *B. mycooides* yang digunakan dalam penelitian ini, menunjukkan sifat pertumbuhan dengan fase adaptasi yang relatif cepat yaitu 2 jam. Sedangkan fase *log* terjadi pada jam ke-2 hingga jam ke-10 sebagai titik puncak dengan nilai sebesar 1,369 sel/ml.
- Rata-rata aktivitas enzim protease kasar pada perlakuan suhu yang berbeda yaitu perlakuan A (Suhu 20°C) 4,677 µg/ml/menit, B (Suhu 30°C) 5,004 µg/ml/menit, C (Suhu 40°C) 5.140 µg/ml/menit, D (Suhu 50°C) 5.077 µg/ml/menit. Perlakuan suhu yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($F_{hitung} > F_{5\%}$) dan didapatkan aktivitas optimum pada suhu 40°C sebesar 5,140 µg/ml/menit.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dari penelitian ini tentang pemurnian enzim protease dari bakteri *Bacillus mycooides* yang mempunyai potensi tinggi karena kebutuhan terhadap enzim protease masih cukup tinggi di masyarakat khususnya dibidang industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Hikmah. 2010. Jenis dan Sifat Enzim. Diakses melalui <http://biohikmah.blogspot.com/2010/10/jenis-dan-sifat-enzim.html>. Pada Tanggal 15 Oktober 2010
- Apsari, A. A. 2011. Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Proteolitik Berdaya Kuat dari Ikan Kuniran (*Upeneus sulphureus*) dan Jambal Roti Manyung (*Arius thalassinus*) Asin Berformalin. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet and M. Wootton. 2007. Ilmu Pangan. Penerjemah H. Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Darwis dan Sukara, (1990), Penuntun Praktikum Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim, IPB, Bogor.
- Downes, F. P. and K. Ito. 2001. *Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Food*. American Public Health Association. Washington, D. C.
- Fatimah, I. 2005. Isolasi Bakteri Proteolitik dari Pencernaan Ikan Nila Galur Gift (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas) dan Karakterisasi Protease Ekstraselulernya. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor.
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Insititut Pertanian Bogor. Bogor
- . 1992. Mikrobiologi Pangan I. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- . 1993. Analisis Mikrobiologi Pangan. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Grata, K., Nabrdalik, M., Latala, A. 2010. *Evaluation of Proteolytic Activity of Bacillus mycooides Strains*. Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski. Vol 4 No. 2
- Hidayat, N., M.C. Padaga dan S. Suhartini. 2006. Mikrobiologi Industri. Andi. Yogyakarta
- Hurrigan. W.F and E. Margaret. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press. San Francisco.
- Judoamidjojo M., A. A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1990. Teknologi Fermentasi. PAU-Bioteknologi IPB. Bogor.
- Kamelia, R., M. Sindumarta dan D. Natalia. 2005. Isolasi dan Karakteristik Protease Intraseluler Termotabil dari Bakteri Bacillus

stearothermophilus. Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung. Bandung.

Kosim dan Putra. S.R. 2009. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. FMIPA - ITS. Surabaya.

Kumar, R and Ritika V. 2010. *Protease Production by Bacillus mycoides Immobilized on Different Matrices*. Biotechnology Department. India.

Kuswanto, R. H. 1987. Isolasi dan Pengujian Aktivitas Eenzim. Proyek Pengembangan Perguruan Tinggi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta

La Anas. 2008. Ikan Teri. <http://teri.laanassite.id/>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 14.00 WIB.

Lehninger, A. L. 1998. Biochemistry. Academic Press. New York

Maharanie, N. 2005. Pengaruh Penambahan Bakteri Gram Positif Hasil Isolasi dari Saluran Pencernaan Udang dalam Pakan untuk Meningkatkan Daya Cerna dan Pertumbuhan Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). Thesis Magister Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.

Mangunwidjaja, D., Suryani A. 1994. Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya, Jakarta.

Muchtadi, D., Palupi, N.S., dan M. Astawan. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.

Nazir. 1988. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta Timur. 543 hal

Ngili, Y. 2009. Biokimia: Struktural dan Fungsi Biomolekul. Graha Ilmu. Yogyakarta

Pakpahan, R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Thermofilik dari Sumber Air panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Sekolah Pasca Sarjana. Universitas Sumatera Utara. Medan

Panji, S., Paulus S., dan Fauzi. 2002. Produksi dan Stabilisasi Desaturase dari *Absidia corymbifera*, Majalah Menara Perkebunan.

Pelezar, M. J. Dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta.

Putranto., Wendy S. 2006. Purifikasi dan Karakterisasi Protease yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam Fermentasi Susu Sapi Perah. Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI.

Qadar, S. A. U., Shireen E., Iqbal S., Anwar A. 2009. *Optimization of protease production from newly isolated strain of Bacillus sp.* Institute of Sustainable Halophyte Utilization and Department of Biochemistry University of Karachi. Pakistan

Resmiati, T., S. Diana, S. Astuty. 2003. Pengasinan Ikan Teri (*Stolephorus spp.*) dan Kelayakan Usahanya di Desa Karanghantu Serang. Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran Fakultas Pertanian. Bandung.

Roosdiana, Kartikaningsih, Suharjo, R. Peranginangin, Murdinah. 2003. Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus sp* Penghasil Protease dari Kulit Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sanguineus*). Jurnal Ilmu-ilmu Hayati Volume 15 no. 2 Desember 2003. Fakultas MIPA dan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 140

Sa'id, E. G. 1987. Bioindustri. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.

Salmah, 2004, Analisa Pertumbuhan Mikroba pada Fermentasi, Program Studi Teknik Kimia Universitas Sumatera Utara.

Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. hal. 276.

Seeley jr.H.W. and Vandemark. P.J. 1976. *Selected Exercises From Microbes in Action a Laboratory Manual of Microbiology*. Cornell University. London.

Sperber, M.S, and Torrie, J.H. 1982. *Requirement of Clostridium botulinum for Growth and Toxin Production*. J. Food Tech. 36 (1), 89-97.

Sumarsih, Sri, 2003. Diktat Kuliah: Mikrobiologi Dasar, Fakultas Pertanian UPN "Veteran" Yogyakarta.

Wikipedia. 2009. Teri. <http://Teri/Wikipedia.id>. Diakses 20 Januari 2012. Pukul 22.00 WIB.

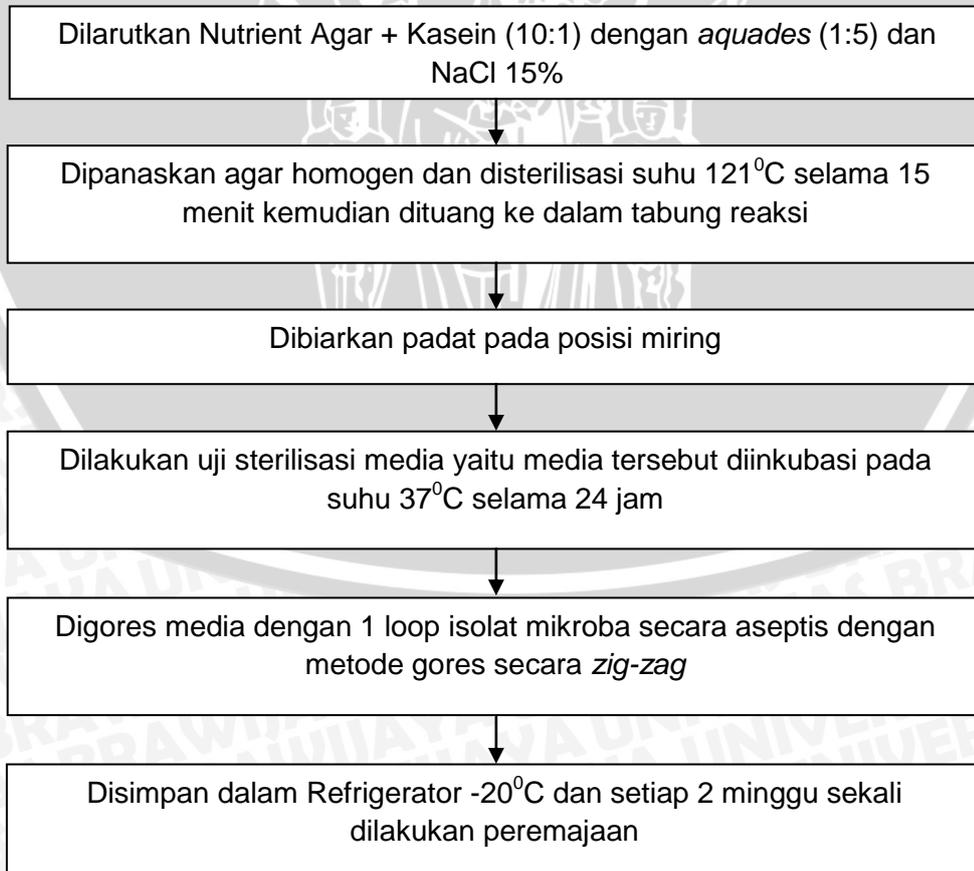


Lampiran 1. Pembuatan Kultur Stok Isolat

1.a Pembuatan Kultur Stok Isolat

- Dilarutkan *Nutrien Agar* dan Kasein (10:1) dengan *aquades* (1:5) dan NaCl 15%
- Dipanaskan agar homogen
- Disterilisasi suhu 121°C selama 15 menit kemudian dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml
- Dibiarkan padat pada posisi miring
- Dilakukan uji sterilisasi media yaitu media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- Digores media dengan 1 loop isolat mikroba secara aseptis dengan metode gores secara *zig-zag*

1.b Skema Pembuatan Kultur Stok Isolat



repository.ub.ac.id

Lampiran 2. Inokulasi Bakteri *B. mycoides* Pada Media *Luria Bertani* Agar

2.a Inokulasi Bakteri *B. mycoides* pada Media *Luria Bertani* Agar

- Disiapkan bahan berupa: pepton 1 g; yeast extract 0,5 g; NaCl 1 g dan Agar 1,5 g
- Dilarutkan ke dalam 100 ml *aquades*
- Dihomogenkan dan disterilisasi
- Dituang ke dalam cawan ± 20 ml dan ditunggu sampai beku
- Diinokulasikan 1 ose *B. mycoides* dari kultur stok dengan cara *distreak*
- Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam

2.b. Skema Inokulasi Bakteri *B. mycoides* pada Media *Luria Bertani*) Agar

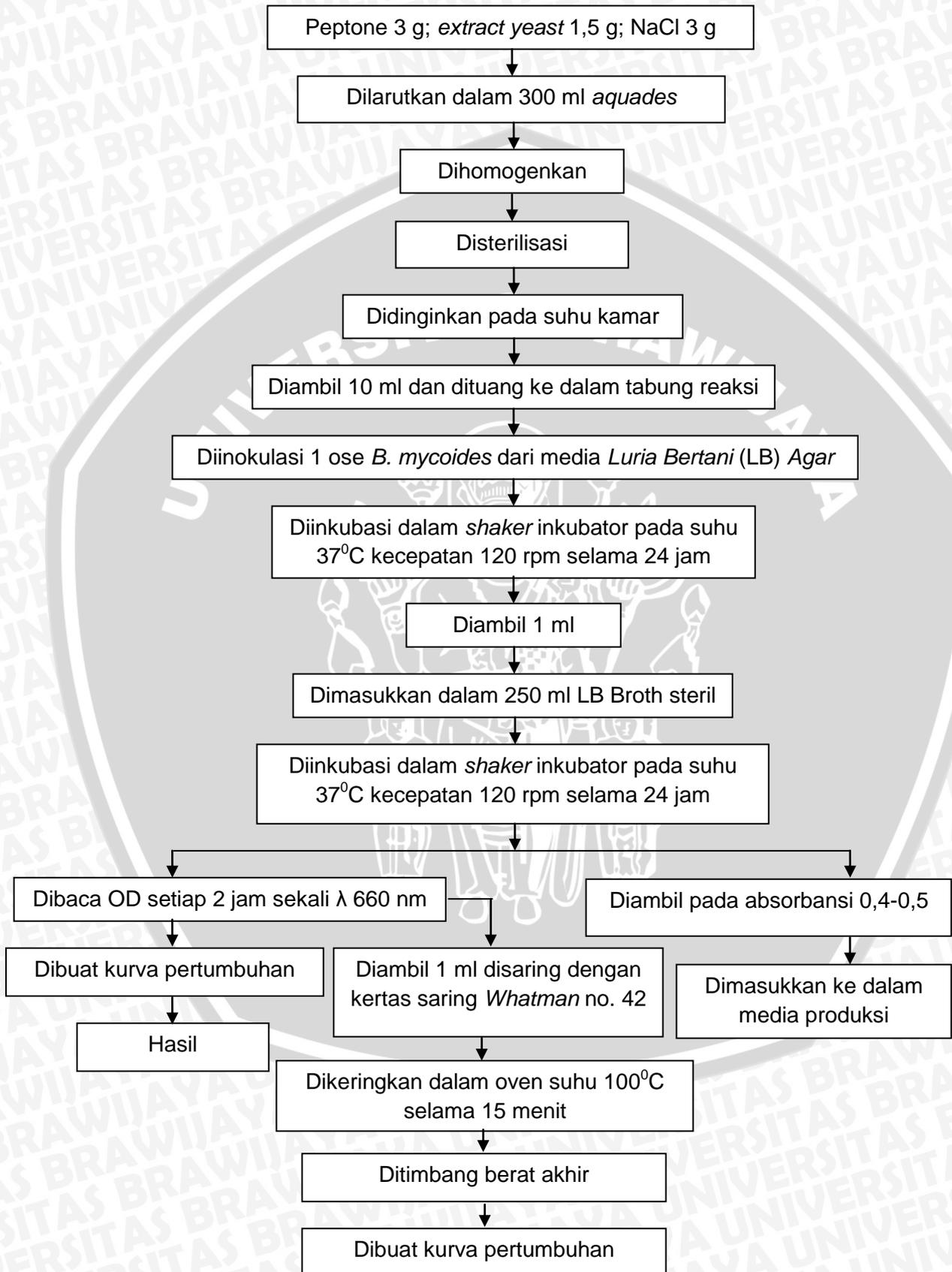


Lampiran 3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

3. a. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

- Disiapkan bahan berupa: pepton 3 g; yeast extract 1,5 g; NaCl 3 g
- Dilarutkan dalam 300 ml *aquades*
- Dihomogenkan dan disterilisasi
- Didinginkan pada suhu kamar
- Diambil 10 ml dan dituang ke dalam tabung reaksi
- Diinokulasi 1 ose *B. mycooides* dari media *Luria Bertani* (LB) Agar
- Diinkubasi dalam shaker incubator pada suhu 37°C kecepatan 120 rpm selama 24 jam
- Diambil 1 ml dan dimasukkan dalam 250 ml LB *Broth* steril
- Diinkubasi dalam shaker incubator pada suhu 37°C kecepatan 120 rpm selama 24 jam
- Dibaca OD setiap 2 jam sekali λ 660 nm
- Dibuat kurva pertumbuhan
- Sisa hasil pembacaan *Optical Density* (OD), disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 42
- Dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C selama 15 menit
- Ditimbang berat akhir
- Dibuat kurva pertumbuhan

3. b. Skema Pembuatan Kurva Pertumbuhan



Lampiran 4. Produksi *Crude Enzim*

4. a. Produksi *Crude Enzim*

- Disiapkan bahan berupa: pepton 10 g; *yeast extract* 5 g; ; NaCl 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –2 g/L; K_2HPO_4 – 3 g/L; KH_2PO_4 – 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 g/L
- Dilarutkan dengan *aquades* menjadi 1 liter
- Diatur pH menjadi 7 dan disterilisasi
- Ditunggu sampai dingin pada suhu kamar
- Dimasukkan 1 ml sampel pada absorbansi 0,4-0,5
- Diinkubasi dalam *shaker* inkubator pada suhu 37°C kecepatan 120 rpm selama 24 jam
- Disentrifuge pada 4000 rpm selama 20 menit
- Dibuat larutan enzim dengan menambahkan larutan diluent dengan perbandingan yang sesuai
- Larutan enzim



4. b. Skema Produksi Crude Enzim

Peptone 10 g; yeast extract 5 g; NaCl 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2 g/L;
 K_2HPO_4 – 3 g/L; KH_2PO_4 – 2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 g/L

Dilarutkan dengan *aquades* menjadi 1 liter

Diatur pH menjadi 7

Disterilisasi

Ditunggu sampai dingin pada suhu kamar

Dimasukkan 1 ml sampel pada absorbansi 0,4-0,5

Diinkubasi dalam *shaker* inkubator pada suhu
37°C kecepatan 120 rpm selama 24 jam

Disentrifuge pada 4000 rpm selama 20 menit

Dibuat larutan enzim dengan menambahkan larutan
diluent dengan perbandingan yang sesuai

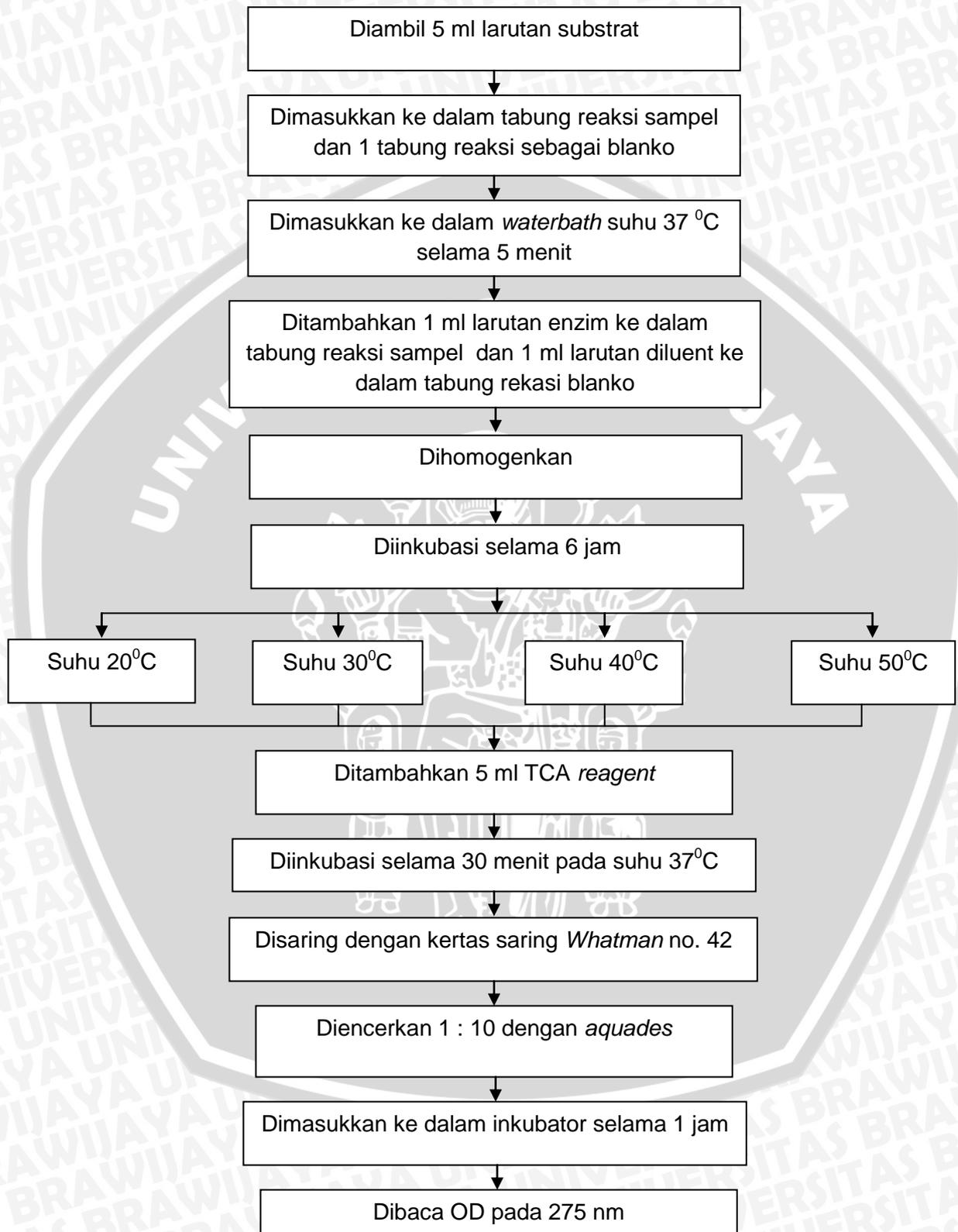
Larutan enzim

Lampiran 5. Analisis Aktivitas Protease

5. a. Penentuan Suhu Optimum (Kuswanto, 1987)

- Diambil 5 ml larutan substrat
- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi sampel dan 1 tabung reaksi sebagai blanko
- Dimasukkan ke dalam *waterbath* suhu 37 °C selama 5 menit
- Ditambahkan 1 ml larutan enzim ke dalam tabung reaksi sampel dan 1 ml larutan diluents ke dalam tabung reaksi blanko
- Dihomogenkan
- Diinkubasi selama 6 jam pada Suhu 20°C; Suhu 30°C; Suhu 40°C; Suhu 50°C
- Ditambahkan 5 ml TCA *reagent*
- Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C
- Disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 42
- Diencerkan 1 : 10 dengan *aquades*
- Dimasukkan ke dalam inkubator selama 1 jam
- Dibaca OD pada 275 nm

5. b. Skema Penentuan Suhu Optimum



Lampiran 6. Pembuatan Larutan

1. a. Pembuatan Larutan Substrat

- Larutan yang mengandung 3,025 g (0,05 M) Tris (hidroksi metil) *amino methane* dan 4 ml 1 N HCl dimasukkan dalam *aquades* 250 ml
- Ditambahkan 35 g kasein pekat
- Dipanaskan 30 menit dalam *waterbath* suhu 100⁰ C
- Dihomogenkan
- Didinginkan pada suhu kamar
- Diatur pH 7 dengan menambahkan HCl 70 ml 0,2 N
- Diencerkan menjadi 500 ml dengan *aquades*

1. b. Skema Pembuatan Larutan substrat

Larutan yang mengandung 3,025 g (0,05 M) Tris (hidroksi metil) *amino methane* dan 4 ml 1 N HCl dimasukkan dalam *aquades* 250 ml

Ditambahkan 35 g kasein pekat

Dipanaskan 30 menit dalam *waterbath* suhu 100⁰ C

Dihomogenkan

Didinginkan pada suhu kamar

Diatur pH 7 dengan menambahkan HCl 70 ml 0,2 N

Diencerkan menjadi 500 ml dengan *aquades*

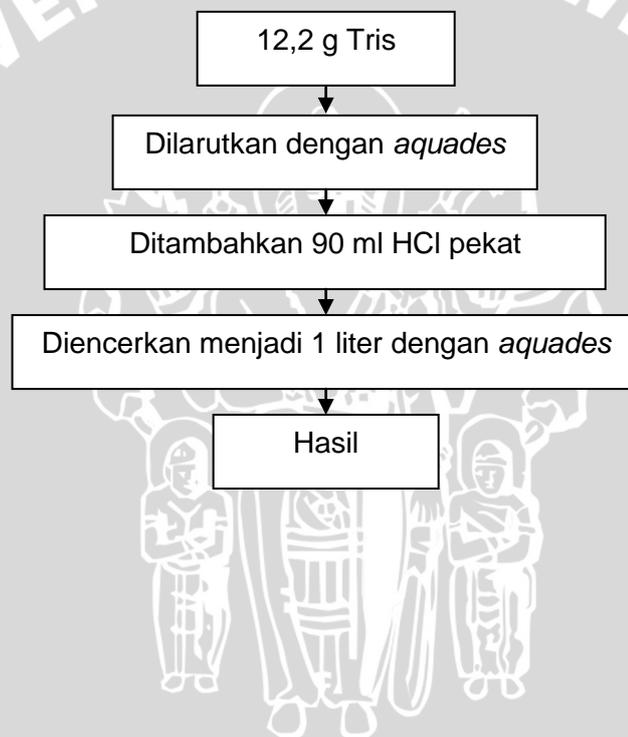
Hasil

Lampiran 6. Lanjutan

2. a. Pembuatan Larutan Diluent

- Ditimbang sebanyak 12,2 g Tris
- Dilarutkan dengan *aquades*
- Ditambahkan 90 ml HCl pekat
- Diencerkan menjadi 1 liter dengan *aquades*
- Hasil

2. b. Skema Pembuatan Larutan Diluent



Lampiran 6. Lanjutan

3. a. Pembuatan TCA Reagent

- Ditimbang sebanyak 18 g asam trichloroasetat dan 19 g natrium asetat
- Dilarutkan dengan *aquades* 250 ml
- Ditambahkan 20 g asam asetat glasial
- Diencerkan menjadi 1 liter dengan *aquadest*

3. b. TCA Reagent

18 g asam trichloroasetat dan 19 g natrium asetat

Dilarutkan dengan *aquades*

Ditambahkan 20 g asam asetat glasial

Diencerkan menjadi 1 liter dengan *aquades*

4. a. Pembuatan Larutan Enzim

- Larutan Diluent ditambah dengan larutan enzim dengan konsentrasi yang sesuai

4. b. Skema Pembuatan Larutan Enzim

Larutan Diluent

Ditambahkan larutan enzim dengan konsentrasi yang sesuai

Hasil

- Larutan enzim mempunyai absorbansi antara 0,160-0,700

Lampiran 7. Data Penelitian

Tabel Data Absorbansi

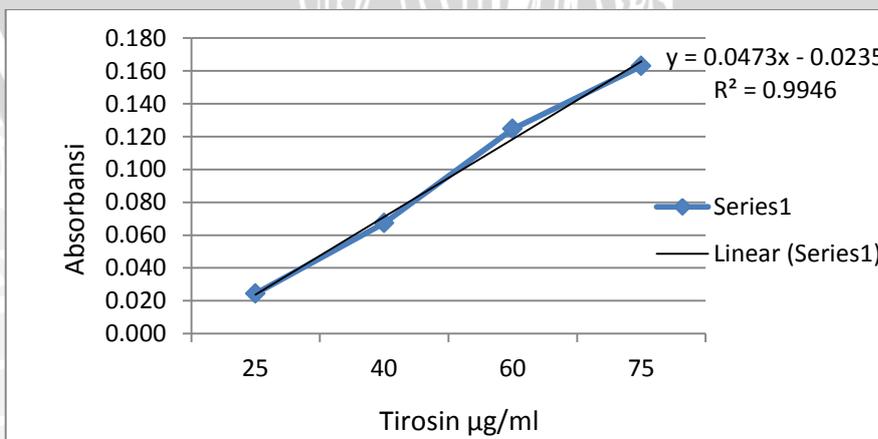
Perlakuan	Ulangan					
	1	2	3	4	5	6
Suhu 20	0.759	0.825	0.742	0.773	0.855	0.826
Suhu 30	0.913	0.844	0.928	0.922	0.844	0.856
Suhu 40	0.988	0.859	1.003	0.983	1.029	0.985
Suhu 50	0.933	0.953	0.912	0.996	0.947	0.831

Tabel Blanko

Blanko	Rerata
0.673	0.65975
0.697	
0.616	
0.653	

Tabel Hasil Pengamatan Suhu Setelah Dikurangi Blanko

perlakuan	Ulangan					
	1	2	3	4	5	6
Suhu 20	0.099	0.165	0.082	0.113	0.195	0.166
Suhu 30	0.253	0.184	0.268	0.262	0.184	0.196
Suhu 40	0.328	0.199	0.343	0.323	0.369	0.325
Suhu 50	0.273	0.293	0.252	0.336	0.287	0.171



Gambar Kurva Standar Tirosin

Lampiran 7. Lanjutan

Tabel Gram Enzim Dalam Sampel ($\mu\text{g/ml}$)

Perlakuan	Ulangan					
	1	2	3	4	5	6
Suhu 20	2.601	4.005	2.239	2.899	4.644	4.027
Suhu 30	5.878	4.410	6.197	6.069	4.410	4.665
Suhu 40	7.473	4.729	7.793	7.367	8.346	7.410
Suhu 50	6.303	6.729	5.856	7.644	6.601	4.133

Keterangan: Gram enzim didapatkan dari rumus regresi pada kurva standar tirosin $Y = 0,047x - 0,023$ dengan $R^2 = 0,944$

Tabel Gram Enzim Dalam Sampel ($\mu\text{g/ml}$)

Perlakuan	Ulangan					
	1	2	3	4	5	6
Suhu 20	8.670	13.351	7.465	9.663	15.479	13.422
Suhu 30	19.592	14.699	20.656	20.230	14.699	15.550
Suhu 40	24.911	15.762	25.975	24.557	27.819	24.699
Suhu 50	21.011	22.429	19.521	25.479	22.004	13.777

Keterangan: Gram enzim setelah dikalikan dengan 10 (faktor pengenceran) dan dibagi dengan 3

Tabel Data Aktivitas Enzim Protease Pada Perlakuan Suhu ($\mu\text{g/ml/menit}$)

Perlakuan	Ulangan						Total	Rerata	STD
	1	2	3	4	5	6			
Suhu 20	4.489	4.854	4.321	4.596	4.947	4.857	28.064	4.677	0.247
Suhu 30	5.069	4.916	5.093	5.084	4.916	4.949	30.026	5.004	0.086
Suhu 40	5.167	4.957	5.182	5.162	5.205	5.164	30.838	5.140	0.091
Suhu 50	5.100	5.127	5.067	5.175	5.119	4.875	30.464	5.077	0.105
							119.393		

Lampiran 7. Lanjutan

Perhitungan Data:

$$\frac{A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis}}{A \text{ 275 untuk 1,50 } \mu\text{g tirosin/ml}} \times \frac{\text{volume}}{\text{waktu}} \times \frac{\text{Faktor Pengenceran}}{3} =$$

$$\frac{A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis}}{0,003117} \times \frac{11}{30} \times \frac{10}{3} =$$

$$A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis} \times 392,157 =$$

$$PC = \frac{A \text{ 275 untuk hasil hidrolisis} \times 392,157}{\text{gram enzim dalam sampel}} =$$

Suhu 20°C

1. 0,099

$$PC = \frac{0,099 \times 392,157}{8,67} = 4,489$$

2. 0.165

$$PC = \frac{0,165 \times 392,157}{13,351} = 4,854$$

3. 0.082

$$PC = \frac{0,082 \times 392,157}{7,465} = 4,321$$

4. 0.113

$$PC = \frac{0,113 \times 392,157}{9,663} = 4,596$$

5. 0.195

$$PC = \frac{0,195 \times 392,157}{15,479} = 4,947$$

6. 0.166

$$PC = \frac{0,166 \times 392,157}{13,422} = 4,857$$

Suhu 30°C

1. 0.253

$$PC = \frac{0,253 \times 392,157}{19,592} = 5,069$$

2. 0.184

$$PC = \frac{0,184 \times 392,157}{14,699} = 4,916$$

3. 0.268

$$PC = \frac{0,268 \times 392,157}{20,656} = 5,093$$

4. 0.262

$$PC = \frac{0,262 \times 392,157}{20,230} = 5,084$$

5. 0.184

$$PC = \frac{0,184 \times 392,157}{14,699} = 4,916$$

6. 0.196

$$PC = \frac{0,196 \times 392,157}{15,550} = 4,949$$

Lampiran 7. Lanjutan

Suhu 40°C

1. 0,328

$$PC = \frac{0,328 \times 392,157}{24.911} = 5,167$$

2. 0,199

$$PC = \frac{0,199 \times 392,157}{15.762} = 4,957$$

3. 0,343

$$PC = \frac{0,343 \times 392,157}{25.975} = 5,182$$

4. 0,323

$$PC = \frac{0,323 \times 392,157}{24.557} = 5,162$$

5. 0,369

$$PC = \frac{0,369 \times 392,157}{27.819} = 5,205$$

6. 0,325

$$PC = \frac{0,325 \times 392,157}{24.699} = 5,164$$

Suhu 50°C

1. 0,273

$$PC = \frac{0,273 \times 392,157}{21.011} = 5,100$$

2. 0,293

$$PC = \frac{0,293 \times 392,157}{22.429} = 5,127$$

3. 0,252

$$PC = \frac{0,252 \times 392,157}{19.521} = 5,067$$

4. 0,336

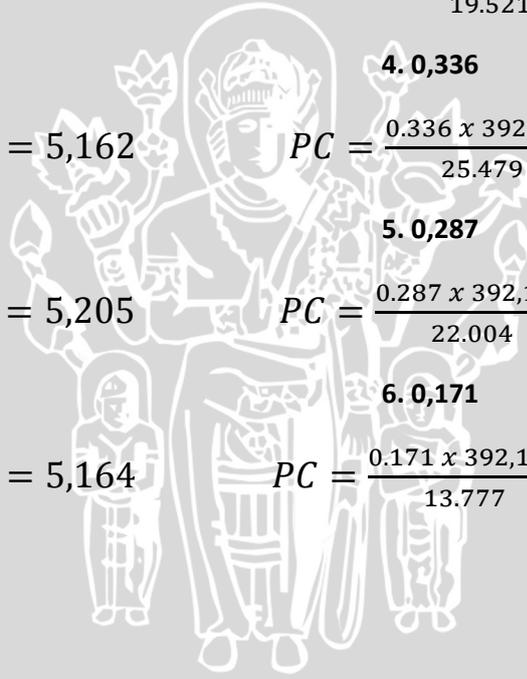
$$PC = \frac{0,336 \times 392,157}{25.479} = 5,175$$

5. 0,287

$$PC = \frac{0,287 \times 392,157}{22.004} = 5,119$$

6. 0,171

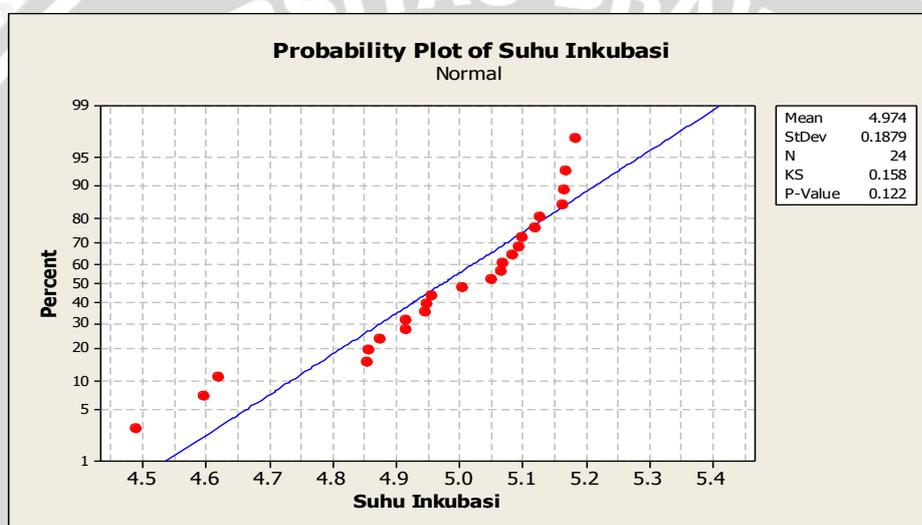
$$PC = \frac{0,171 \times 392,157}{13.777} = 4,875$$



Lampiran 8. Analisis Aktivitas Protease

Perlakuan	Ulangan						Total	Rerata	STD
	1	2	3	4	5	6			
Suhu 20	4.489	4.854	4.321	4.596	4.947	4.857	28.064	4.677	0.247
Suhu 30	5.069	4.916	5.093	5.084	4.916	4.949	30.026	5.004	0.086
Suhu 40	5.167	4.957	5.182	5.162	5.205	5.164	30.838	5.140	0.091
Suhu 50	5.100	5.127	5.067	5.175	5.119	4.875	30.464	5.077	0.105
							119.393		

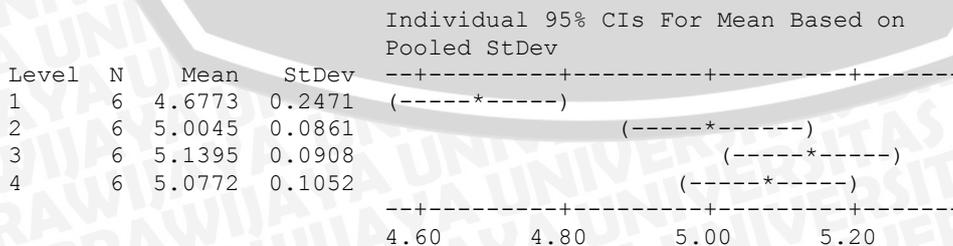
Hasil Uji Normalitas Kolmogorof-Smirnov ($p > 0,05$)



One-way ANOVA: Aktivitas Protease Unit versus Suhu

Source	DF	SS	MS	F	P
Suhu	3	0.7618	0.2539	11.57	0.000
Error	20	0.4389	0.0219		
Total	23	1.2007			

S = 0.1481 R-Sq = 63.45% R-Sq(adj) = 57.97%



Pooled StDev = 0.1481

Lampiran 8. Lanjutan

Perhitungan Jumlah Kuadrat (JK):

$$FK = \frac{\sigma^2}{r \times n} = \frac{119,393^2}{24} = 593,95$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D6^2 - FK \\ &= 4,489^2 + 4,854^2 + 4,321^2 + \dots + 4,875^2 - 593,95 \\ &= 1,20 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= \frac{(\sum A)^2 + (\sum B)^2 + (\sum C)^2 + (\sum D)^2}{6} - FK \\ &= \frac{(28,064)^2 + (30,026)^2 + (30,838)^2 + (30,464)^2}{6} - 593,95 \end{aligned}$$

$$= 594,71 - 593,95$$

$$= 0,76$$

$$\text{JK Galat} = \text{JK Total Perlakuan} - \text{JK Perlakuan}$$

$$= 1,20 - 0,76$$

$$= 0,44$$

ANOVA:

SK	db	JK	KT	Fhit	F 5%
Perlakuan	3	0,76	0,25427	11,59**	3,10
Galat	20	0,44	0,02195		
Total	23	1,20			

Keterangan: Berbeda nyata

Lampiran 8. Lanjutan

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

$$BNT_a = t_a (\text{db galat}) \times \sqrt{\frac{2S^2}{Ulangan}}$$

$$BNT_{0,05} = t_{0,05} (20) \times \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Galat}}{Ulangan}}$$

$$= 2,086 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,02195}{6}}$$

$$= 2,068 \times 0,0855$$

$$= 0,178$$

Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Aktivitas Protease

Perlakuan	Rata-rata	Notasi BNT _{0,05}
A (Suhu 20°C)	4,677	a
B (Suhu 30°C)	5,004	b
C (Suhu 40°C)	5,140	c
D (Suhu 50°C)	5,077	bc

Lampiran 9. Data dan Perhitungan Analisis Gravimetri

Tabel 1. Data Hasil Analisis Gravitometri Dengan Kertas Saring

Jam	Berat Awal (gr)	Berat Akhir (gr)	Biomassa sel (%)
2	0,1778	0,1786	0,450
4	0,1822	0,1823	0,055
6	0,1833	0,1885	2,837
8	0,1772	0,1776	0,225
10	0,1818	0,1827	0,495
12	0,1623	0,1626	0,185
14	0,1704	0,1711	0,411
16	0,1849	0,1863	0,757

$$\text{Biomassa sel \%} = \frac{(\text{Berat Akhir} - \text{Berat Awal})}{\text{Berat Awal}} \times 100\% =$$

1. 2 jam $(\%) = \frac{(0,1786 - 0,1778)}{0,1778} \times 100\% = 0,450$

2. 4 jam $(\%) = \frac{(0,1823 - 0,1822)}{0,1822} \times 100\% = 0,055$

3. 6 jam $(\%) = \frac{(0,1885 - 0,1833)}{0,1833} \times 100\% = 2,837$

4. 8 jam $(\%) = \frac{(0,1776 - 0,1772)}{0,1772} \times 100\% = 0,225$

5. 10 jam $(\%) = \frac{(0,1827 - 0,1818)}{0,1818} \times 100\% = 0,495$

6. 12 jam $(\%) = \frac{(0,1626 - 0,1623)}{0,1623} \times 100\% = 0,185$

7. 14 jam $(\%) = \frac{(0,1711 - 0,1704)}{0,1704} \times 100\% = 0,411$

8. 16 jam $(\%) = \frac{(0,1863 - 0,1849)}{0,1849} \times 100\% = 0,757$