

**UJI AKTIVITAS PROTEASE EKSTRASELULAR BAKTERI  
PROTEOLITIK USUS BURUNG PUYUH (*Coturnix japonica*)  
PADA MEDIA TEPUNG BUNGKIL KEDELAI**

**SKRIPSI**

oleh:

**INGE LIBERTINA**

**0510910029-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2009**

**UJI AKTIVITAS PROTEASE EKSTRASELULAR BAKTERI  
PROTEOLITIK USUS BURUNG PUYUH (*Coturnix japonica*)  
PADA MEDIA TEPUNG BUNGKIL KEDELAI**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang biologi

oleh:

**INGE LIBERTINA**

**0510910029-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2009**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS PROTEASE EKSTRASELULAR BAKTERI  
PROTEOLITIK USUS BURUNG PUYUH (*Coturnix japonica*)  
PADA MEDIA TEPUNG BUNGKIL KEDELAI**

oleh :

**Inge Libertina**

**0510910029-91**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 09 Nopember 2009  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang biologi

**Pembimbing I**

**Dra.Tri Ardyati, M.Agr.Ph.D**  
**NIP. 19671213-199103-2**

**Pembimbing II**

**Dr.Ir Osfar Sjojfan, M.Sc**  
**NIP. 131 803 146**

**Mengetahui,**  
**Ketua Jurusan Biologi,**  
**Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Dr. Sri Rahayu, M.Kes**  
**NIP. 19620528-198701-2**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Inge Libertina  
NIM : 0510910029-91  
Jurusan : Biologi  
Penulis Tugas Akhir berjudul : Uji Aktivitas Protease Ekstraselular Bakteri Proteolitik Usus Burung Puyuh (*Coturnix japonica*) pada Media Tepung Bungkil Kedelai

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Tugas Akhir ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka TA ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/ referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi TA saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 23 November 2009  
Yang menyatakan,

(Inge Libertina)  
NIM. 0510910029-91

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**UJI AKTIVITAS PROTEASE EKSTRASELULAR BAKTERI  
PROTEOLITIK USUS BURUNG PUYUH (*Coturnix japonica*) PADA  
MEDIA TEPUNG BUNGKIL KEDELAI**

oleh :  
**Inge Libertina**  
**0510910029-91**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 09 Nopember 2009  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang biologi**

**Pembimbing I**

**Dra.Tri Ardyati, M.Agr.Ph.D**  
**NIP. 19671213-199103-2**

**Pembimbing II**

**Dr.Ir Osfar Sjofjan, M.Sc**  
**NIP. 19600422-198811-1001**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi,  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Dr. Sri Rahayu, M.Kes**  
**NIP. 19620528-198701-2**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Inge Libertina  
NIM : 0510910029-91  
Jurusan : Biologi  
Penulis Tugas Akhir berjudul : Uji Aktivitas Protease Ekstraselular Bakteri Proteolitik Usus Burung Puyuh (*Coturnix japonica*) pada Media Tepung Bungkil Kedelai

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Tugas Akhir ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka TA ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/ referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi TA saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 23 Nopember 2009  
Yang menyatakan,

(Inge Libertina)  
NIM. 0510910029-91

# UJI AKTIVITAS PROTEASE EKSTRASELULAR BAKTERI PROTEOLITIK ASAL USUS BURUNG PUYUH (*Coturnix japonica*) PADA MEDIA TEPUNG BUNGKIL KEDELAI

Inge Libertina, Tri Ardyati<sup>1</sup>, Osfar Sjojfan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

<sup>2</sup>Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan,  
Universitas Brawijaya, Malang

## Abstrak

Bakteri proteolitik adalah penghasil enzim protease ekstraselular yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti asam amino. Bakteri ini dapat ditemukan sebagai mikroflora normal pada saluran pencernaan burung puyuh (*Coturnix japonica*). Protein terkandung dalam kedelai merupakan salah satu nutrisi penting untuk meningkatkan produktivitas burung puyuh. Penambahan bakteri proteolitik penting untuk meningkatkan kemampuan cerna pakan oleh burung puyuh (*Coturnix japonica*). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri proteolitik dan mengetahui pertumbuhan serta aktivitas proteasanya. Tahapan penelitian meliputi isolasi bakteri proteolitik dengan menggunakan media *Calcium Caseinate Agar*, pertumbuhan dan uji aktivitas protease dilakukan pada media tepung bungkil kedelai 2%. Jumlah sel bakteri dan aktivitas protease dianalisis dengan uji asosiasi melalui korelasi Pearson. Isolasi bakteri pada usus burung puyuh didapatkan enam isolat bakteri yaitu PP-1, PP-2, PP-4, PP-5, PP-7 dan PP-9. Isolat terpilih yaitu PP-4 memiliki aktivitas enzim tertinggi pada media tepung bungkil kedelai cair (*soybean meal broth*) 2% terjadi pada fase akhir logaritmik yaitu sebesar 0,150 Unit dengan jumlah populasi  $8,57 \times 10^8$  cfu/ml pada waktu inkubasi 24 jam. Jumlah sel bakteri PP-4 sebanding dengan nilai aktivitas proteasanya.

**Kata kunci** : protease, bakteri proteolitik, tepung bungkil kedelai, burung puyuh

# EXTRACELLULAR PROTEASE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM *Coturnix japonica* TRACTUS DIGESTIVUS IN SOYBEAN MEAL MEDIUM

Inge Libertina<sup>1</sup>, Tri Ardyati<sup>1</sup>, Osfar Sjoifan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biology Department, Mathematics and Natural Science Faculty

<sup>2</sup> Animal Nutrition Department, Faculty of Animal Husbandry  
Brawijaya University, Malang

## Abstract

Proteolytic bacteria are able to produce extracellular protease, an enzyme that hydrolyzed protein to simple molecule, such as amino acid. This bacteria can be found as normal microflora in tractus digestivus of quail (*Coturnix japonica*). Protein contained in soybean becomes one of the important nutrition as poultry feed to increasing productivity of quail. Therefore addition of proteolytic bacteria was important to increase feeding of *Coturnix japonica*. This research was carried out in order to isolate proteolytic bacteria and to determine their growth and protease activity. This research was conducted by isolation of proteolytic bacteria using Calcium Caseinate Agar medium. Growth and protease activity assay was performed in 2% of Soybean Meal Broth medium. The number of bacteria cell and protease activity was analyzed by Pearson correlation. Isolation of proteolytic bacteria from *Coturnix japonica* digestive tract resulted in six isolates, PP-1, PP-2, PP-4, PP-5, PP-7 and PP-9. Isolate PP-4 was selected for next step treatment because it has the highest protease activity in 2% of Soybean Meal Broth medium was 0,150 Unit and it was observed at the end of logarithmic phase, with the cell number is  $8,57 \times 10^8$  cfu/ml at 24 hours incubation. The cell number of isolate PP-4 was in accordance with the protease activity.

**Key words** : protease, proteolytic bacteria, , soybean meal, *Coturnix japonica*

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan tetapi terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah dalam menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## KATA PENGANTAR

*Bismillahirrahmanirrahim Alhamdulillah*, segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, nikmat serta hidayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul **Uji Aktivitas Protease Ekstraselular Bakteri Proteolitik Usus Burung Puyuh (*Coturnix japonica*) pada Media Tepung Bungkil Kedelai** ini dapat diselesaikan. Penulisan skripsi ini bertujuan sebagai syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains. Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua Orang tua dan keluarga besar yang banyak memberikan dukungan baik secara moril maupun materiil dalam segala kondisi.
2. Dra. Tri Ardyati, M.Agr,Ph.D selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan dan masukan selama penelitian dan penulisan Skripsi.
3. Dr.Ir. Osfar Sjojfan, M.Sc selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan dan saran selama penelitian dan penulisan Skripsi.
4. Dr.Suharjono, M.Si dan Prof.Aullani'am,drh DES selaku penguji yang telah memberikan masukan bagi penulisan Skripsi.
5. Irfan Mustafa, S.Si, M.Si selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran bagi penulisan Skripsi.
6. Bu Umi Kulsum yang telah banyak membantu dan memberi dukungan atas penelitian.
7. Keluarga besar jurusan Biologi beserta staf dan karyawan yang telah banyak memberikan kemudahan dalam pembelajaran di Biologi.
8. Teman-teman satu kelompok burung puyuh (Winda, Ika, Pupi, Yulia, Nurul dan Titik) serta teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi yang banyak memberi masukan tentang Skripsi.
9. Teman-teman angkatan metamorphosis 2005 yang telah memberi semangat untuk melaksanakan Skripsi, dan
10. Keluarga besar Kertosentono 88, Malang yang telah memberikan semangat demi keberhasilan pelaksanaan Skripsi.

Penulis menyadari bahwa penulisan Skripsi ini masih perlu disempurnakan, untuk itu sangat diharapkan adanya saran dan kritik untuk penyempurnaan penelitian dan pengembangan lebih lanjut tema Skripsi.

Semoga Skripsi ini bermanfaat bagi pembaca dan perkembangan ilmu pengetahuan. *Amin*.

**Malang, 23 Nopember 2009**

**Penulis**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	<b>i</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim Protease.....	4
2.2 Mikroorganisme Proteolitik.....	6
2.3 Kandungan Protein pada Tepung Bungkil Kedelai.....	7
2.4 Tepung Bungkil Kedelai sebagai Substrat Pertumbuhan Bakteri Proteolitik .....	10
2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	11
2.6 Peran Utama Hemolisis Darah Terkait dengan Patogenisitas .....	12
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	14
3.2 Isolasi Bakteri Proteolitik .....	14
3.3 Pemurnian Sampel Bakteri Proteolitik .....	14
3.4 Deteksi Kemampuan Proteolitik .....	15
3.5 Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik.....	15
3.5.1 Pengamatan morfologi koloni.....	15

	Halaman
3.5.2 Pewarnaan Gram .....	15
3.5.3 Uji katalase .....	16
3.5.4 Uji oksidase .....	16
3.5.5 Pewarnaan endospora .....	16
3.5.6 Uji patogenisitas .....	17
3.6 Pembuatan Kurva Standar Bakteri .....	17
3.7 Pembuatan Starter Bakteri Proteolitik pada media Media Tepung Bungkil Kedelai.....	18
3.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri pada Media <i>Calcium Caseinate Broth</i> (CCB).....	18
3.9 Pembuatan Kurva Pertumbuhan pada Media Tepung Bungkil Kedelai .....	19
3.10 Pembuatan Kurva Baku Tirosin .....	19
3.11 Uji Aktivitas Protease .....	19
3.12 Rancangan Percobaan dan Analisis Data .....	20
 <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Isolasi dan Penentuan Karakter Morfologi Koloni Bakteri Proteolitik .....	21
4.2 Karakteristik Pertumbuhan Isolat Proteolitik Terpilih.....	23
4.3 Penentuan Konsentrasi Tepung Bungkil Kedelai untuk Pertumbuhan Bakteri Proteolitik .....	28
4.4 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat PP-4 pada media <i>Calcium Caseinate Broth</i> (CCB) .....	29
4.5 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat PP-4 pada Media Tepung Bungkil Kedelai.....	31
 <b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan .....	35
5.2 Saran .....	35
 <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	36
<b>LAMPIRAN</b> .....	42

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Mikroba penghasil enzim protease dan jenis enzim yang dihasilkan .....	6
2.2 Persyaratan mutu standar bungkil kedelai .....	8
2.3 Komposisi nutrisi tepung bungkil kedelai .....	9
2.4 Pengaruh enzim protease terhadap penyerapan asam amino dan nitrogen pada unggas petelur .....	11
3.1 Perbandingan stok inokulum dan media steril .....	17
4.1 Karakter morfologi koloni bakteri .....	22
4.2 Seleksi isolat bakteri berdasarkan diameter zona bening dan aktivitas protease.....	23
4.3 Karakter pertumbuhan isolat terpilih .....	24
4.4 Jumlah sel bakteri PP-4 pada berbagai konsentrasi .....	29



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Hidrolisis ikatan peptida oleh endopeptidase termolysin.....	4
2.2 Hidrolisis ikatan peptida dari exopeptidase carboxypeptidase .....	5
4.1 Hasil pewarnaan Gram isolat PP-1, Gram negatif , bentuk <i>coccus</i> , berwarna merah, dengan adanya endospora di bagian sentral .....	25
4.2 Hasil pewarnaan Gram isolat PP-4, Gram positif, bentuk basil pendek, warna ungu dengan adanya endospora.....	26
4.3 Pembentukan zona bening isolat terpilih a. isolat PP-1 dan b. isolat PP-4 .....	26
4.4 Diagram uji Oksidase .....	27
4.5 Hemolisis darah bakteri PP-1 (kiri) dan PP-4 (kanan) pada media <i>Blood Agar</i> (BAP) .....	28
4.6 Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri PP-4 pada Media CCB.....	30
4.7 Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri PP-4 pada media tepung bungkil kedelai.....	33

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi media .....	42
2. Komposisi reagen uji aktivitas protease .....	42
3. Kurva baku tirosin .....	43
4. Kurva standar pada media <i>Calcium Caseinate Broth</i> .....	43
5. Hasil pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora .....	44
6. Hasil uji aktivitas protease .....	44
7. Korelasi antara jumlah sel dan aktivitas enzim protease pada media <i>Calcium Caseinate Broth</i> (CCB).....	46
8. Korelasi antara jumlah sel dan aktivitas enzim protease pada media tepung bungkil kedelai.....	46
9. Skema kerja .....	47



## DAFTAR ISTILAH

<u>Istilah/ singkatan</u>	<u>keterangan</u>
<i>B. thermoglucosidasius</i>	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>
BK	Berat Kering
Ca	Calcium
CCB	<i>Calcium Caseinate Broth</i>
cfu	colony forming unit
<i>circulair</i>	bentuk bulat
<i>convex</i>	elevasi cembung
<i>entire</i>	tepi rata
FOS	Fruktosa Oligosakarida
<i>Low convex</i>	elevasi sedikit cembung
M	Molar
NA	<i>Nutrient Agar</i>
nm	nano meter
OD	Optical Density
<i>Opaque</i>	struktur dalam tidak ditembus cahaya
P	Phospor
PP-1	bakteri proteolitik puyuh kode 1
PP-2	bakteri proteolitik puyuh kode 2
PP-4	bakteri proteolitik puyuh kode 4
PP-5	bakteri proteolitik puyuh kode 5
PP-7	bakteri proteolitik puyuh kode 7
PP-9	bakteri proteolitik puyuh kode 9
ppb	Part Per Billion
ppm	Part Per Million
SK	Serat kasar
TCA	Trichloro Acetic Acid
<i>Transparent</i>	struktur dalam ditembus cahaya
<i>Translucent</i>	struktur dalam sedikit tembus cahaya
TPC	<i>total plate count</i>
U	Unit

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Burung puyuh (*Coturnix japonica*) merupakan salah satu jenis unggas yang memiliki kemampuan produksi telur 20% lebih banyak dibandingkan jenis unggas lainnya. Burung puyuh juga memiliki daya tahan yang tinggi terhadap berbagai penyakit, sehingga dapat direkomendasikan sebagai makanan konsumsi yang sehat. Ketahanan burung puyuh terhadap berbagai penyakit salah satunya disebabkan adanya berbagai jenis bakteri intestinal yang terdapat dalam saluran pencernaan, antara lain mikroflora normal, bakteri asam laktat dan beberapa bakteri nonpatogen (Adams, 2000).

Burung puyuh memiliki siklus hidup yang pendek dengan kemampuan produksi telur 250 sampai 300 butir pertahun. Oleh karena itu pemberian pakan yang tepat diperlukan untuk memenuhi kebutuhan burung puyuh dalam memaksimalkan produksi telur. Salah satu bahan utama pakan burung puyuh adalah tepung bungkil kedelai yang banyak mengandung protein, dengan tingkat kecernaan 34,7%. Kemampuan cerna pakan tepung bungkil kedelai oleh burung puyuh dapat ditingkatkan dengan penambahan bakteri proteolitik. Bakteri ini mampu menghasilkan enzim protease yang dapat memecah protein menjadi senyawa yang lebih sederhana. Dengan demikian pertumbuhan dan produktivitas burung puyuh dapat ditingkatkan (Adams, 2000).

Mikroorganisme penghasil protease antara lain bakteri, kapang, maupun khamir. Penggunaan bakteri sebagai penghasil protease memiliki berbagai keuntungan dibandingkan mikroorganisme lainnya. Hal ini disebabkan bakteri memiliki waktu inkubasi yang relatif singkat dengan produksi enzim dapat ditingkatkan dalam skala besar. Produksi protease pada industri dihasilkan oleh *Bacillus* sp. yaitu sebesar 60% dari total enzim yang dibutuhkan pasaran. (El-safey dan Abdul, 2004). Bakteri proteolitik mampu menghasilkan enzim protease ekstraselular, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel atau ke dalam media pertumbuhan (Winarno, 1983). Protease dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti

peptida kecil dan asam amino. Enzim protease dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida. Eksopeptidase terdiri atas karboksi peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino eksopeptidase dari arah gugus amino terminal. Endopeptidase memecah ikatan peptida dari sisi dalam atau pada arah gugus asam amino non terminal (Mubarik *et al.*, 2000).

Beberapa *Bacillus* diketahui mampu menghasilkan protease di antaranya *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01 (Naiola dan Nunuk, 2007). *Bacillus natto* dan *Bacillus* sp. adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim protease dari fermentasi tepung bungkil kedelai. *Bacillus natto* merupakan bakteri intestinal yang mampu mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat yang menguntungkan, yaitu *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* yang berkolonisasi dalam saluran pencernaan pada usus dua belas jari (Mitsuoka, 1990).

Sumber protein merupakan salah satu nutrisi penting bagi pertumbuhan bakteri proteolitik yang harus ditambahkan ke dalam media sebagai sumber nitrogen (N). Tepung bungkil kedelai merupakan salah satu komposisi pakan burung puyuh yang memiliki kandungan protein tinggi. Menurut Kunta (2007) kandungan protein dalam bungkil kedelai dapat mencapai 50% dan diketahui degradasi protein dalam saluran pencernaan unggas mencapai 34,7% berat bungkil kedelai yang diberikan. Enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik diharapkan dapat meningkatkan kemampuan cerna terhadap tepung bungkil kedelai oleh burung puyuh.

Bakteri proteolitik yang diisolasi dari usus burung puyuh diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat penghasil enzim protease. Enzim protease yang dihasilkan merupakan indikasi bahwa bakteri proteolitik tersebut mampu tumbuh dengan baik pada media tepung bungkil kedelai. Hal ini juga digunakan untuk mengetahui aktivitas protease bakteri proteolitik dalam media pakan burung puyuh (*Coturnix japonica*) untuk meningkatkan kemampuan cerna terhadap tepung bungkil kedelai.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana karakteristik isolat bakteri proteolitik dari usus

burung puyuh (*Coturnix japonica*)?

2. Bagaimana pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri proteolitik asal usus burung puyuh (*Coturnix japonica*) pada media tepung bungkil kedelai?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk

1. Mengetahui karakteristik isolat bakteri proteolitik usus burung puyuh (*Coturnix japonica*).
2. Mengetahui pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri proteolitik pada media tepung bungkil kedelai yang merupakan media pakan burung puyuh (*Coturnix japonica*).

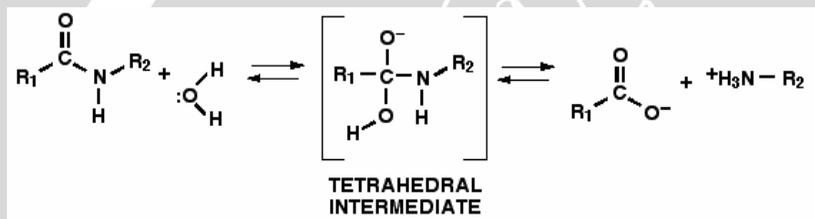
### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah isolat bakteri proteolitik usus burung puyuh dapat digunakan sebagai mikroorganisme tambahan untuk meningkatkan kemampuan cerna terhadap pakan dan meningkatkan kualitas telur. Bakteri proteolitik juga dapat digunakan untuk meningkatkan produktivitas burung puyuh (*Coturnix japonica*).

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Enzim Protease

Enzim merupakan protein yang digunakan sebagai katalisator untuk reaksi-reaksi kimia pada sistem biologis. Enzim dapat diperoleh dari tiga sumber yaitu hewan, tanaman, dan mikroorganisme (Trevor, 1991). Protease merupakan salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dan banyak digunakan di berbagai industri, baik industri pangan maupun non pangan, yakni industri makanan, farmasi, industri detergen. Protease merupakan salah satu hal penting untuk mempelajari tentang struktur protein dan polipeptida (Bhosale *et al.*, 1995).

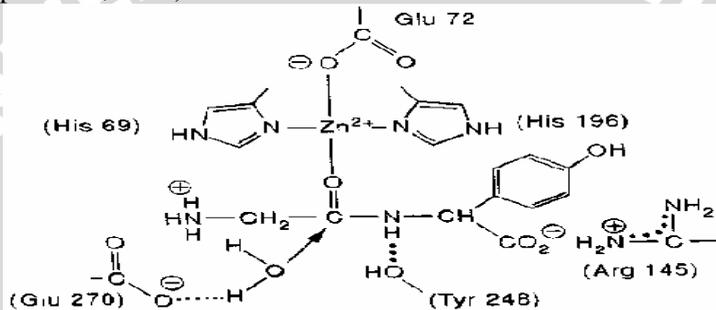


Gambar 2.1 Hidrolisis ikatan peptida oleh endopeptidase termolysin (Nelson and Cox, 2000)

Protease merupakan enzim yang mampu memecah protein. Enzim ini memecah ikatan peptida pada protein menjadi peptida yang lebih sederhana dan asam amino. Protease dapat digolongkan menjadi dua kelompok besar, yaitu : a. Eksopeptidase, terdiri dari peptidase dan amino (ekso) peptidase, yang berturut-turut memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan gugus amino terminal; b. Endopeptidase, memecah protein atau ikatan peptida dari sisi dalam atau pada arah gugus asam amino non terminal (Diwan, 2005). Enzim digolongkan menjadi enam kelas berdasarkan daya katalisisnya, yaitu oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase. Enzim protease termasuk dalam kelas enzim hidrolase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis. Contoh enzim yang termasuk dalam kelas hidrolase adalah karboksilesterase, hidrolase yang menghidrolisis gugusan ester karboksil; lipase, hidrolase yang menghidrolisis lemak (ester lipida)

dan protease, hidrolase yang menghidrolisis protein dan polipeptida (Trevor, 1991).

Mikroorganisme menghasilkan protease ekstraselular yang secara alamiah berperan penting dalam proses metabolisme dan pengaturan sel (Suryanti, 2001). Bakteri khususnya yang bersifat Gram positif, sering digunakan untuk produksi enzim ekstraselular dalam skala industri misalnya protease, lipase, dan amilase. *Bacillus* merupakan salah satu bakteri Gram positif yang digunakan dalam penelitian maupun untuk kepentingan industri, karena kemampuannya menghasilkan enzim dalam jumlah besar dan stabil (Gupta *et al.*, 2002).



Gambar 2.2 Hidrolisis ikatan peptida dari exopeptidase carboxypeptidase (Nelson and Cox, 2000)

Protease dari *Bacillus* sp. merupakan enzim ekstraselular. Isolasi enzim protease dapat dilakukan dengan cara memisahkan cairan dari biomassa melalui sentrifugasi. Aktivitas protease tertinggi dari *Bacillus* sp. dapat dihasilkan dengan memberikan kondisi optimum yang memengaruhi kerja enzim protease, di antaranya pH substrat, waktu inkubasi, dan pemilihan media fermentasi (Suryanti, 2001). Enzim protease *Bacillus* spp. dapat diproduksi dengan menumbuhkan bakteri tersebut pada substrat tertentu misalnya kasein. Enzim ekstraselular bakteri proteolitik endopeptidase dapat dihasilkan pada pH optimum yaitu pH netral (Secades and Guijarro, 1999).

Bakteri proteolitik dapat digunakan sebagai pakan tambahan (*feed additive*) bagi unggas. Pakan tambahan bakteri proteolitik bermanfaat untuk meningkatkan kemampuan cerna terhadap nutrisi yang terkandung pada pakan misalnya kandungan protein tinggi.

Mikroorganisme penghasil enzim protease yang ditambahkan pada pakan unggas mampu meningkatkan konversi jumlah pakan secara nyata. Mikroorganisme ini juga meningkatkan berat badan unggas yang cukup signifikan. Hal ini menunjukkan peranan utama enzim protease dalam produktivitas unggas adalah dengan memperbaiki penggunaan nutrisi dalam pakan (El-safey dan Abdul, 2004).

## 2.2 Mikroorganisme Proteolitik

Perkembangan teknologi yang pesat terutama di bidang bioteknologi menjadikan mikroorganisme sebagai salah satu penghasil protease yang potensial. Protease dihasilkan oleh berbagai jenis mikroorganisme antara lain bakteri, kapang, maupun khamir (Suhartono, 1989). Mikroorganisme penghasil enzim protease dan jenis enzim yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Mikroorganisme penghasil enzim protease dan jenis enzim yang dihasilkan

Mikroorganisme	Jenis Enzim	pH optimum
<b>Bakteri</b>		
• <i>Bacillus cereus</i>	netral	7,0
• <i>B. licheniformis</i>	netral	6,5-7,5
• <i>B. megaterium</i>	netral	7,0
• <i>B. polymixa</i>	netral	6,0-7,2
• <i>B. stearothermophilus</i>	netral	6,9-7,2
• <i>B. pumilus</i>	alkali	10,3-10,8
• <i>B. subtilis</i>	alkali	10,3-10,8
• <i>B. amyloliquefaciens</i>	alkali	10,2-10,7
<b>Kapang</b>		
• <i>Aspergillus niger</i>	asam	2,8
• <i>A. Oryzae</i> <sup>1</sup>	asam	3,0
• <i>A. ochraceus</i>	netral	7,5
• <i>A. sojae</i>	netral	6,5-7,5
• <i>A. candidus</i>	alkali	10,0-11,0
• <i>A. Oryzae</i> <sup>2</sup>	alkali	8,5-10,0

Sumber : (Suhartono, 1989)

Berbagai jenis bakteri yang dapat menghasilkan protease antara lain *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, dan *Serratia*. Selain itu kapang *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Mucor* juga merupakan penghasil enzim protease ekstraselular. *Bacillus* banyak menghasilkan protease serin alkali dan protease logam, diantaranya enzim yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* yang termasuk dalam golongan protease serin alkali dan lebih dikenal dengan nama subtilin. Protease yang dihasilkan oleh kapang kebanyakan dalam bentuk serin alkali (Suhartono, 1989).

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraselular, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar sel atau ke dalam media pertumbuhan. Bakteri proteolitik dapat dibagi menjadi bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif tidak membentuk spora misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*, bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif membentuk spora misalnya *Bacillus*, dan bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya *Clostridium*. Bakteri proteolitik memecah protein menjadi peptida dan asam-asam amino. Bakteri ini menggunakan asam amino dan peptida sebagai sumber energi atau untuk sintesis protein kembali. Penguraian protein oleh mikroorganisme dimulai dengan hidrolisis protein secara enzimatik menjadi asam amino, selanjutnya asam amino yang dibebaskan digunakan untuk metabolisme (Fardiaz, 2000).

Bakteri proteolitik yang terdapat pada saluran pencernaan memengaruhi mekanisme penyerapan lemak dan protein yang terjadi di usus. Pengaruh tersebut secara fisiologis ditunjukkan oleh adanya mekanisme pereduksian protein *turnover* dan kebutuhan energi dalam usus sebagai akibat menurunnya proliferasi sel *crypt* dan berkurangnya masa usus. Bakteri ini juga dapat meningkatkan persediaan asam amino yang dibutuhkan oleh jaringan lain (Abun, 2008).

### **2.3 Kandungan Protein pada Tepung Bungkil Kedelai**

Menurut Pusri (2008) unsur nutrisi yang terkandung di dalam bahan pakan secara umum terdiri atas air, mineral, protein, lemak, karbohidrat, dan vitamin. Setiap unsur nutrisi berperan sesuai dengan fungsinya terhadap tubuh ternak yaitu untuk mempertahankan hidup

dan bereproduksi secara normal. Nutrisi yang dibutuhkan unggas antara lain 1) sumber energi adalah keseluruhan bahan pakan ternak yang kandungan protein kasarnya kurang dari 20% dan dengan konsentrasi serat kasar kurang dari 18% ; 2) sumber protein adalah bahan pakan ternak yang mempunyai kandungan protein minimal 20%. Golongan ini dapat dibedakan menjadi tiga kelompok yaitu tanaman sebagai sisa hasil pertanian, tanaman yang sengaja ditanam, misalnya lamtoro, turi, dan kaliandra, dan bahan yang dihasilkan dari hewan (tepung ikan dan tepung tulang); 3) sumber vitamin dan mineral dapat berasal dari tanaman maupun hewan, mengandung beberapa vitamin dan mineral dengan konsentrasi sangat bervariasi bergantung pada tingkat pemanenan, umur, pengolahan, jenis dan penyimpanan.

Tabel 2.2 Persyaratan mutu standar bungkil kedelai

Komposisi	Mutu I	Mutu II
Kadar air maksimum (%)	12	11
Protein kasar minimum (%)	46	40
Serat kasar maksimum (%)	6,5	9
Abu maksimum (%)	7	8
Lemak maksimum (%)	3,5	5
Kalsium (%)	0,2-0,4	0,2-0,4
Fosfor (%)	0,5-0,8	0,5-0,8
Aflatoxin maksimum (ppb)	50	50
Urea (%)	-	-

Keterangan : - tidak boleh terdapat urea

Sumber : (Jajo, 2008)

Kedelai merupakan bahan sejenis kacang yang memiliki nilai tertinggi sebagai bahan pakan. Kedelai utuh atau telah digiling tidak dapat digunakan sebagai pakan secara langsung. Penggunaan kedelai sebagai pakan secara langsung memengaruhi proses oksidasi yang akan menyebabkan bahan cepat menjadi tengik. Harga kedelai yang mahal dan harus impor tidak memungkinkan untuk menggunakan kedelai utuh sebagai pakan secara langsung. Kedelai bernilai ekonomi lebih tinggi sebagai minyak, sehingga sebagai bahan pakan

dapat digunakan sisa ekstraksinya yaitu bungkil kedelai. Komposisi normal pemberian kedelai pada ternak yaitu tidak lebih dari 25% dalam seluruh komposisi pakan (Kunta, 2007). Persyaratan mutu standar bungkil kedelai meliputi kandungan nutrisi dan batas toleransi aflatoxin. Persyaratan mutu standar bungkil kedelai yang harus dipenuhi terdapat pada Tabel 2.2.

Bungkil kedelai atau *soybean meal* adalah sisa dari ekstraksi minyak biji kedelai, yang merupakan salah satu sumber protein nabati yang dibutuhkan oleh unggas. Bungkil kedelai juga mengandung energi tinggi selain kandungan protein yang relatif tinggi, (Murni dkk., 2008). Asam amino merupakan komponen utama penyusun protein, yang terbagi menjadi dua kelompok yaitu asam amino esensial dan asam amino non esensial. Bungkil kedelai mengandung protein sebesar 50% digunakan sebagai pakan unggas. Protein yang digunakan untuk pakan unggas pedaging berkisar 15-30% dan unggas petelur yaitu 10-25% (Mastika, 2000). Komposisi nutrisi tepung bungkil kedelai menurut Kunta (2007) dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Komposisi nutrisi tepung bungkil kedelai

Komposisi	Kadar Nutrisi (%)	Komposisi	Kadar Nutrisi (%)
Berat Kering	81	Arginin	7,7
Abu	9,4	Asam glutamate	2,3
Air	11,6	Histidin	5,3
Serat Kasar	10,4	Isoleusin	7,9
Bahan ekstrak tanpa N	16,9	Lysine	6,6
Ca	1,3	Methyoinin	1,4
P	0,3	Phenilalanin	5,1
Protein	42,7	Threonin	3,9
Lemak	9,0	Triptofan	1,5
Protein tercerna	36,3	Valine	5,3
Tyrosin	43		

Sumber : (Kunta, 2007)

Bungkil kedelai juga mengandung zat antinutrisi yaitu inhibitor tripsin yang dapat mengganggu pertumbuhan unggas. Inhibitor

tripsin akan mengalami kerusakan dengan perlakuan pemanasan zat tersebut. Oleh karena itu bungkil kacang kedelai mengalami pemanasan terlebih dahulu sebelum diperas minyaknya. Pemanasan bungkil kedelai yang dilakukan tidak boleh terlalu tinggi, karena akan merusak kadar lisin.

Kadar lisin yang rendah akan memengaruhi pertumbuhan unggas karena nutrisi utama yang dibutuhkan oleh unggas adalah kombinasi antara lisin dan methionin yang terdapat dalam pakan. Bungkil kedelai yang baik mengandung air tidak lebih dari 1dua persen (Sitompul, 2004). Asam amino esensial lisin dan methionin merupakan faktor yang sangat diperhatikan dalam pencampuran pakan unggas. Kebutuhan akan lisin berkisar antara 0,45-0,85% total berat badan (50 kg berat badan) sedangkan metionin adalah 0,10-0,3dua persen. Bungkil kedelai diketahui mengandung asam amino lisin 1,17-2,91% dan metionin 0,70-2,51%, sehingga dapat digunakan sebagai sumber lisin dan methionin untuk pakan unggas (Sitompul, 2004).

#### **2.4 Tepung Bungkil Kedelai sebagai Substrat Pertumbuhan Bakteri Proteolitik**

Menurut Kunta (2007) tepung bungkil kedelai merupakan salah satu bahan pakan yang diberikan kepada burung puyuh (*Coturnix japonica*). Tepung bungkil kedelai mengandung kadar protein sebesar 40% dan merupakan salah satu bahan yang dapat digunakan sebagai substrat atau sumber prebiotik yaitu Fruktosa Oligosakarida (FOS). Kadar protein yang tinggi dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri proteolitik pada saluran pencernaan burung puyuh. Tepung bungkil kedelai digunakan oleh bakteri proteolitik sebagai sumber nitrogen untuk menghasilkan enzim protease. Pemberian pakan dengan pelet (mengandung kadar protein sebesar 40-45%) pada unggas diketahui dapat meningkatkan aktivitas enzim protease yang dapat diukur dengan menggunakan metode Bergmeyer. Hal ini menunjukkan bahwa protein dari pelet digunakan oleh mikroba untuk menghasilkan enzim protease dalam saluran pencernaan unggas (Yamin dan Neltje, 2007).

Produksi enzim protease oleh bakteri dalam saluran pencernaan unggas membantu meningkatkan kemampuan cerna pakan unggas.

Mekanisme kerja enzim dalam saluran pencernaan unggas adalah merusak dinding sel dari partikel-partikel pakan, sehingga akan membebaskan nutrisi dan menjadikannya lebih mudah dicerna oleh enzim-enzim pencernaan. Mekanisme ini dapat meningkatkan ketersediaan nutrisi, yang pada akhirnya akan menghasilkan campuran yang lebih homogen dalam saluran gastrointestinal. Hal ini juga menghasilkan penyerapan yang lebih baik energi lemak seperti halnya karbohidrat, dan memperbaiki penggunaan nitrogen (El-safey dan Abdul, 2004). Pengaruh pemberian enzim dalam pakan tepung bungkil kedelai pada unggas petelur ditunjukkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Pengaruh enzim protease terhadap penyerapan asam amino dan nitrogen pada unggas petelur

Sumber asam amino	Perlakuan kontrol (%)	Penambahan protease (%)
Lisin	82,6	84,0
Methionin	85,9	88,8
Bungkil kedelai	34,7	43,3

Sumber : (El-safey dan Abdul, 2004)

## 2.5 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor. Faktor-faktor tersebut menentukan efektivitas kerja suatu enzim. Beberapa faktor yang memengaruhi kerja enzim menurut Brooks dan Stephen (2005) adalah sebagai berikut :

- a. Substrat, enzim mempunyai spesifitas yang tinggi. Apabila substrat sesuai dengan enzim maka kinerja enzim juga akan optimal.
- b. pH (keasaman), enzim mempunyai kesukaan pada pH tertentu. Beberapa enzim optimal bekerja pada kondisi asam, namun ada beberapa enzim yang optimal pada kondisi basa, namun sebagian besar enzim bekerja optimal pada pH netral.
- c. Waktu, waktu kontak atau reaksi antara enzim dan substrat menentukan efektivitas kerja enzim. Semakin lama waktu reaksi maka kerja enzim juga akan semakin optimum.

- d. Konsentrasi atau jumlah enzim, konsentrasi enzim berbanding lurus dengan efektivitas kerja enzim. Semakin tinggi konsentrasi maka kerja enzim akan semakin baik dan cepat.
- e. Suhu, setiap enzim mempunyai kisaran suhu optimum untuk efektivitas kerja enzim.
- f. Produk akhir, reaksi enzimatik selalu melibatkan dua hal yaitu substrat dan produk akhir.

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme merupakan salah satu produk metabolit primer. Enzim digunakan oleh bakteri untuk mencerna substrat yang diperlukan bagi pertumbuhan dan perkembangbiakannya. Enzim kasar (*crude enzyme*) oleh bakteri diproduksi pada fase logaritmik atau eksponensial. Kecepatan pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri pada fase ini terjadi sangat cepat dan maksimum akibat peningkatan konsumsi nutrisi dan produksi metabolit. Komposisi sel bakteri dan hasil metabolit yang dihasilkan relatif konstan dalam jangka waktu tertentu, hal ini tergantung pada sifat-sifat bakteri dan kondisi lingkungan (Fardiaz, 2000). Penelitian Solikah (2009) menunjukkan bahwa enzim protease dari isolat P-9 bakteri proteolitik diproduksi optimum pada substrat susu berdasarkan kurva pertumbuhan yang terjadi pada fase logaritmik pada waktu inkubasi 24 jam. Hal ini menunjukkan aktivitas enzim protease tertinggi diproduksi pada fase logaritmik.

## 2.6 Peran Utama Hemolisis Darah Terkait dengan Patogenisitas

Hemolisis pada *blood agar* digunakan untuk persiapan atau konfirmasi identifikasi dari banyak tipe bakteri penting secara klinis. Hemolisis seringkali digunakan untuk diagnosa agen infeksi. Proses hemolisis ini ditunjukkan oleh adanya produksi hemolysin atau enzim yang mampu bereaksi dengan sel darah merah dan mampu melisis sel darah tersebut. Johnson (2001) membagi hemolisis pada media *Blood Agar Plate* menjadi tiga macam yaitu :

- a.  $\alpha$  hemolysis, perubahan warna menjadi kehijauan pada media *blood agar* di sekitar koloni bakteri yang tumbuh. Hal ini merupakan hemolisis sebagian atau partial. Salah satu contoh bakteri yang termasuk dalam hemolisis ini adalah *Streptococcus pneumoniae*

- b.  $\beta$  hemolysis, pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada media *Blood agar*. Hal ini terjadi karena adanya produksi  $\beta$ -lysin yang dihasilkan oleh bakteri yang mampu memecah atau merusak eritrosit darah pada media agar, sehingga terbentuk zona bening di sekitar koloni. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menghemolisis darah secara total. Hal ini seringkali dihubungkan dengan kemampuan virulensi atau patogenisitas.
- c.  $\gamma$  hemolysis, bukan merupakan hemolisis meskipun koloni bakteri dapat tumbuh pada *blood agar*. Hemolisis darah ditunjukkan pada suhu 37 °C dan adanya 5% CO<sub>2</sub>. Hal ini akan mengakibatkan warna kecoklatan atau tidak merubah media dan tanpa adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Mikroflora normal merupakan salah satu contoh mikroorganisme yang termasuk dalam hemolisis  $\gamma$ .



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan mulai bulan Januari sampai September 2009. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan dan Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Biologi Molekular, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Isolasi Bakteri Proteolitik

Burung puyuh dengan jenis kelamin jantan disembelih sebanyak dua ekor pada usia produksi (dua sampai tiga bulan). Burung puyuh kemudian dibedah dan diambil bagian usus halus (satu centimeter di bawah gizzard, dengan panjang usus  $\pm 42-45$  cm). Isi usus halus diurut sebanyak lima g, dimasukkan ke dalam 45 ml garam fisiologis 0,85%, kemudian dihomogenasi dengan vorteks. Suspensi larutan diambil satu mililiter dan dimasukkan ke dalam sembilan mililiter garam fisiologis 0,85% sehingga menjadi suspensi pengenceran  $10^{-2}$ . Pengenceran berseri dilakukan mulai  $10^{-1}$  hingga  $10^{-7}$ . Suspensi larutan dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml dan ditumbuhkan pada medium selektif untuk bakteri proteolitik (*Calcium Caseinate Agar*) dengan metode *pour plate*. Inkubasi dilakukan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam, dan selanjutnya dilakukan pengamatan koloni. Koloni bakteri proteolitik akan menghasilkan zona bening pada media agar (Fardiaz, 1993).

### 3.3 Pemurnian Bakteri Proteolitik

Koloni bakteri tunggal yang berbeda dan menghasilkan zona bening diinokulasikan pada medium proteolitik (*Calcium Caseinate Agar*) dengan metode *quadran streak*. Bakteri kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam sampai diperoleh koloni tunggal yang terpisah. Koloni tunggal bakteri ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* miring untuk pemeliharaan dengan metode *continuous streak*, dilakukan inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, kemudian disimpan dalam *refrigerator*.

### **3.4 Deteksi Kemampuan Proteolitik**

Isolat bakteri proteolitik yang telah murni diinokulasikan pada media *Calcium Caseinate Agar* dengan cara ditotol dengan menggunakan jarum enten, perlakuan ini dilakukan secara duplo. Isolat bakteri kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian diuji dengan melihat luasan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. Luasan zona bening diukur dengan menggunakan jangka sorong digital. Luasnya zona bening di sekitar koloni bakteri tidak mewakili jumlah aktivitas protease yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme, untuk itu diperlukan uji kuantitatif dengan uji aktivitas protease (Susanti, 2003).

### **3.5 Karakterisasi Isolat Bakteri proteolitik**

#### **3.5.1 Pengamatan morfologi koloni**

Pengamatan morfologi koloni bakteri yang tumbuh dilakukan untuk membedakan antara morfologi koloni satu dengan yang lain. Pengamatan morfologi dilakukan pada bentuk koloni, tepian, elevasi, struktur dalam, warna dan diameter koloni.

#### **3.5.2 Pewarnaan Gram**

Isolat bakteri pada *Nutrient Agar* miring berumur 24-48 jam diambil satu oose dan dioleskan pada gelas obyek yang telah ditetesi aquades steril, kemudian diratakan. Apusan bakteri dibuat dengan memfiksasi gelas obyek di atas api bunsen. Apusan kemudian ditetesi larutan Gram A (*Hucker's crystal violet*) selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir pada posisi miring. Apusan dikeringanginkan dan selanjutnya ditetesi dengan Gram B (*Lugol's Iodine*) selama satu menit. Apusan bakteri dicuci kembali pada air mengalir dan dikeringanginkan. Apusan bakteri selanjutnya ditetesi dengan Gram C (alkohol) tidak lebih dari 30 detik, dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringanginkan. Apusan bakteri kemudian ditetesi dengan Gram D (safranin), dibiarkan selama 20 detik, dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Apusan bakteri pada gelas obyek kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi. Sifat pewarnaan Gram yaitu biru-ungu (Gram positif) dan merah-merah muda (Gram

negatif) (Benson, 2002).

### 3.5.3 Uji katalase

Isolat bakteri proteolitik diambil satu oose pada medium *Nutrient Agar* miring yang berumur 24-48 jam dengan teknik aseptis kemudian diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi dengan aquades steril. Gelas obyek kemudian ditetesi dengan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3% sebanyak satu tetes. Uji positif ditunjukkan ketika terdapat gelembung pada saat penetesan  $H_2O_2$ , akan tetapi jika tidak terdapat gelembung maka uji ini dianggap negatif (Fardiaz, 1993). Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim katalase serta untuk mengetahui toleransi isolat terhadap oksigen.

### 3.5.4 Uji oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan cara satu oose isolat murni bakteri berumur 24 jam dioleskan pada kertas uji oksidase (*Bactident Oxidase Test Kit*). Kertas uji oksidase diamati perubahan warnanya setelah 60 detik. Uji oksidase dinyatakan positif jika warna kertas uji oksidase berubah menjadi biru atau mendekati ungu dan negatif jika warna pada kertas uji oksidase tidak mengalami perubahan (Widyakusuma, 2007).

### 3.5.5 Pewarnaan endospora

Pewarnaan endospora dilakukan dengan membuat apusan bakteri. Apusan bakteri dibuat dengan mengambil satu oose isolat bakteri proteolitik dari *Nutrient Agar* miring berumur 48 jam. Isolat kemudian diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi dengan aquades steril dan diratakan. Gelas obyek kemudian difiksasi di atas api bunsen. Apusan bakteri kemudian ditetesi dengan pewarna hijau malakit (*malachite green*) dan diletakkan di atas penangas air selama 10 menit. Apusan bakteri dijaga jangan sampai kering dengan ditetesi kembali pewarna *malachite green* yang baru. Apusan bakteri kemudian dicuci dengan air mengalir secara hati-hati selama 20-30 detik atau sampai pewarna tidak luntur. Gelas obyek kemudian ditetesi dengan safranin (Gram D) selama 30 detik, dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Obyek diamati dengan

menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan menggunakan minyak imersi. Endospora bakteri akan berwarna hijau atau hijau muda, sedangkan sel vegetatif berwarna merah atau merah muda. Endospora yang dihasilkan diamati bentuk dan letaknya (Fardiaz, 1993).

### 3.5.6 Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan dengan cara menginokulasikan satu oose kultur murni bakteri berumur 24-48 jam pada media *Blood Agar* dengan cara *continuous streak*. Isolat bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C, 2-4 hari. Uji positif ditunjukkan apabila media berubah warna menjadi bening secara menyeluruh di sekitar koloni. Uji negatif ditunjukkan apabila media *Blood Agar* tidak mengalami perubahan warna atau tidak terbentuk zona bening di sekitar koloni bakteri. Adanya zona bening menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut dapat menghemolisis darah dengan menghasilkan enzim hemolysin, yang mampu memecah eritrosit sel darah merah untuk pertumbuhannya. Hal ini merupakan indikasi bahwa bakteri tersebut patogen terhadap inang (Johnson, 2001).

### 3.6 Pembuatan Kurva Standar Bakteri

Kurva pertumbuhan dibuat dengan menggunakan isolat bakteri proteolitik yang dapat tumbuh pada media *Calcium Caseinate Broth* (CCB) (metode point 3.8). Suspensi isolat kemudian dihomogenasikan dengan vorteks. Perbandingan antara media steril dan stok inokulum yang dibuat ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Perbandingan Stok Inokulum dan Media Steril

Perbandingan	Stok inokulum (ml)	Media steril (ml)
1:0	3	0
1:1	1,5	1,5
1:2	1	2
1:3	0,7	2,3
1:4	0,6	2,4
1:5	0,5	2,5
1:6	0,4	2,6
1:7	0,3	2,7

Pengenceran stok inokulum dilakukan dengan menambahkan media CCB, dengan perbandingan antara stok inokulum dan media steril yaitu 1:0 ; 1:1 ; 1:2 ; 1:3 ; 1:4 ; 1:5 ; 1:6 dan 1:7. Jumlah sel masing-masing suspensi dihitung dengan menggunakan haemocytometer. *Optical Density* (OD) diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 500 nm.

### **3.7 Pembuatan Starter Bakteri Proteolitik pada Media Tepung Bungkil Kedelai**

Starter dibuat dengan menginokulasikan satu oose isolat murni bakteri proteolitik umur 24 jam pada 10 ml media tepung bungkil kedelai dengan konsentrasi dua persen. Perlakuan konsentrasi sebelumnya dicoba pada konsentrasi satu persen, akan tetapi berdasarkan jumlah selnya selanjutnya dipilih media tepung bungkil kedelai dengan konsentrasi dua persen. Starter kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Perlakuan ini dilakukan untuk melihat kemampuan tumbuh bakteri proteolitik pada media tepung bungkil kedelai. Stok inokulum dibuat dengan menginokulasikan 10 ml starter ke dalam 90 ml media tepung bungkil kedelai. Konsentrasi tepung bungkil kedelai dengan konsentrasi dua persen sebagai media fermentasi pertumbuhan bakteri diketahui dapat meningkatkan degradasi protein dan kemampuan enzimatis dari mikroba tersebut yang termasuk dalam golongan *Bacillus* sp. (Siregar dan Edhi, 2004).

### **3.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri pada Media Calcium Casinate Broth (CCB)**

Starter bakteri sebanyak 10 ml diinokulasikan ke dalam 90 ml media CCB, kemudian dihomogenkan. Stok inokulum bakteri kemudian diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya 20 ml stok inokulum (mengandung  $10^7$  sel/ml bakteri) ditambahkan pada 180 ml media *Calcium Caseinate Broth* untuk dibuat media produksi sebanyak 200 ml. Media produksi kemudian dihomogenasi dan diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37 °C. Kerapatan sel (OD) diukur setiap dua jam sekali hingga tercapai fase stationer dari pertumbuhan bakteri proteolitik.

Kerapatan sel (*Optical density*) diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

### **3.9 Pembuatan Kurva Pertumbuhan pada Media Tepung Bungkil Kedelai**

Starter bakteri sebanyak lima mililiter diinokulasikan ke dalam 45 ml media tepung bungkil kedelai sebagai stok inokulum, kemudian dihomogenkan. Isolat bakteri kemudian diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya sebanyak 15 ml stok inokulum (mengandung  $10^7$  sel/ml bakteri) ditambahkan pada 135 ml media tepung bungkil kedelai sebagai media produksi. Suspensi bakteri kemudian diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan agitasi 120 rpm, suhu 37 °C. Pengambilan sampel bakteri dilakukan setiap enam jam sekali hingga jam ke 48. Setiap titik pengambilan sampel dilakukan pengenceran berseri  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$ , masing-masing dilakukan duplo. Suspensi larutan pada pengenceran  $10^{-4}$  sampai  $10^{-6}$  diambil sebanyak 0,1 ml dan ditumbuhkan pada media agar yang mengandung dua persen tepung bungkil kedelai dengan metode *pour plate*. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, dan selanjutnya dilakukan penghitungan koloni (*total plate count*) (Madigan *et al.*, 2003).

### **3.10 Pembuatan Kurva Baku Tirosin**

Larutan tirosin dengan berbagai konsentrasi (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/ml) disiapkan masing-masing sebanyak 10 ml. Absorbansi masing-masing konsentrasi tirosin diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 275 nm. Persamaan regresi dan grafik hubungan dibuat antara absorbansi terhadap konsentrasi tirosin (Dibkaer, 2001).

### **3.11 Uji Aktivitas Protease**

Suspensi bakteri pada media tepung bungkil kedelai diinkubasi selama 24-48 jam dalam *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Suspensi bakteri kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim kasar protease (*crude enzyme*). Supernatan (larutan enzim) sebanyak 500 µl ditambahkan dengan 500 µl larutan

0,05 M buffer fosfat pH 7. Suspensi kemudian dipreinkubasi pada suhu 37 °C selama lima menit kemudian ditambahkan substrat sebanyak 500 µl (dua persen kasein dalam 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7). Larutan enzim diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan satu mililiter 0,4 M asam trikloroasetat (TCA) dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm, selama 15 menit, suhu 4 °C dengan tujuan agar supernatan benar-benar terpisah dari pelet. Supernatan (*crude enzyme*) diambil sebanyak satu mililiter, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diencerkan dengan *Tris HCl* hingga total volume menjadi dua mililiter. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm (Susanti, 2003). Nilai aktivitas diukur dari kadar tirosin yang diperoleh terhadap kurva baku tirosin dengan rumus (El-Safey and Ammar, 2002):

$$\text{aktivitas enzim} = [\text{tirosin}] \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

dimana =

v = volume total sampel percobaan pada tiap tabung (ml)

p = jumlah enzim (ml)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

### 3.12 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Seleksi kemampuan proteolitik dilakukan dengan rancangan acak lengkap (RAL). Data dianalisis dengan ANOVA dan jika hasilnya berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan's. Data uji aktivitas enzim dan kurva pertumbuhan bakteri proteolitik pada media tepung bungkil kedelai konsentrasi dua persen dilakukan dengan tiga kali ulangan pada kondisi yang homogen (suhu 37 °C, pH 6,8, dan kecepatan agitasi 120 rpm, waktu inkubasi 48 jam) sesuai dengan karakter pertumbuhan bakteri proteolitik. Analisis data tentang jumlah sel dan aktivitas protease dilakukan melalui uji asosiasi menggunakan korelasi Pearson. Menurut Budi (2006) uji asosiasi digunakan untuk mengetahui hubungan yang signifikan yang terdapat antara dua variabel.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi dan Penentuan Karakter Morfologi Koloni Bakteri Proteolitik

Isolasi yang dilakukan terhadap bakteri proteolitik dari usus burung puyuh didapatkan sebanyak enam isolat bakteri yaitu PP-1, PP-2, PP-4, PP-5, PP-7, dan PP-9. Pengamatan morfologi koloni dilakukan untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing isolat yang telah didapatkan. Pengamatan morfologi koloni berdasarkan Benson (2002) terdiri dari bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni. Karakter ke enam isolat bakteri proteolitik yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Seleksi isolat bakteri proteolitik yang dilakukan meliputi pembentukan zona bening, uji aktivitas enzim dan uji patogenisitas dari masing-masing isolat. Hasil pengujian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ke enam isolat bakteri tersebut mampu membentuk zona bening di sekitar koloni bakteri pada media *Calcium Caseinate Agar* (Tabel 4.2). Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mendegradasi protein pada media tumbuh bakteri. Zona bening terbentuk karena protein *casein* yang terkandung di dalam media terdegradasi oleh enzim protease yang dihasilkan bakteri proteolitik (Downes and Ito, 2001).

Enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik berdasarkan uji kualitatif, dapat diketahui dari hasil pengukuran diameter zona bening yang terbentuk di sekitar koloni. Semakin besar zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan oleh bakteri juga semakin besar. Masing-masing isolat bakteri memiliki luas zona bening yang bervariasi. Berdasarkan hasil pengukuran zona bening didapatkan tiga isolat bakteri yang potensial yaitu PP-4, PP-7 dan PP-1. Karakter isolat bakteri proteolitik berdasarkan morfologi koloni ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Karakter morfologi koloni bakteri

Karakter morfologi	PP-1	PP-2	PP-4	PP-5	PP-7	PP-9
Bentuk	circularir	circularir	circularir	circularir	circularir	circularir
Tepian	Entire	entire	entire	entire	entire	Entire
Elevasi	low convex	low convex	low convex	low convex	convex	convex
Struktur dalam	Transparent	opaque	opaque	opaque	translucent	opaque
Warna	Krem	putih	putih	putih	kuning	Krem
Diameter (cm)	0,25	0,4	0,5	0,6	0,3	0,4

Seleksi bakteri proteolitik secara kuantitatif dilanjutkan dengan melakukan pengujian aktivitas enzim protease. Aktivitas protease masing-masing isolat bakteri diukur pada media *Calcium Caseinate Broth* dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam. Aktivitas protease dari masing-masing isolat menunjukkan hasil yang bervariasi antara 0,073-0,871 Unit yang ditunjukkan pada Tabel 4.2. Hasil pengukuran aktivitas protease menunjukkan bahwa isolat PP-1 memiliki aktivitas terbesar yaitu 0,871 Unit, isolat PP-4 sebesar 0,385 Unit dan isolat PP-7 sebesar 0,177 Unit.

Satu unit aktivitas enzim protease menunjukkan banyaknya  $\mu\text{mol}$  produk tirosin yang mampu dibebaskan atau dihidrolisis oleh satu mililiter enzim protease per menit pada kondisi tertentu (Dibkaer, 2001). Hal ini menunjukkan bahwa satu unit aktivitas protease dinyatakan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan material yang larut dalam campuran TCA, yang ekuivalen dengan satu  $\mu\text{mol}$  tirosin dari larutan kasein dua persen (b/v) permenit pada pH 6,8 dan suhu 37 °C. Hasil uji aktivitas protease menunjukkan bahwa besarnya zona bening yang terbentuk tidak berbanding lurus dengan besarnya aktivitas enzim yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Hal ini ditunjukkan oleh isolat PP-4 yang memiliki diameter zona bening terbesar yaitu 19,7 mm tetapi memiliki aktivitas enzim sebesar 0,385 Unit sedangkan isolat PP-1 yang memiliki diameter zona bening 7,38 mm memiliki aktivitas yang lebih besar daripada isolat PP-4 yaitu 0,871 Unit. Hasil pengujian aktivitas protease ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Seleksi isolat bakteri proteolitik berdasarkan diameter zona bening dan aktivitas protease

Nama Isolat	Diameter zona bening (mm)	Aktivitas protease (Unit) $p < 0,05$ ; $\alpha = 95\%$	
		24 jam	48 jam
PP-1	7,38	0,871±0,0015 (f)	0,201±0,0011(f)
PP-2	2,58	0,006±0,0010 (a)	0,073±0,0010 (b)
PP-4	19,71	0,385±0,0005 (e)	0,056±0,0005(a)
PP-5	4,96	0,159±0,0005 (d)	0,101±0,0010 (c)
PP-7	10,59	0,121±0,0005 (c)	0,177±0,0005(e)
PP-9	-	0,046±0,0011 (b)	0,132±0,0005 (d)

Keterangan: - tidak membentuk zona bening

Isolat PP-9 memiliki karakter koloni tumbuh melebar oleh karena itu tidak dilakukan pengukuran diameter zona bening. Isolat PP-7 (Tabel 4.2) menunjukkan bahwa diameter zona yang besar tidak sebanding dengan besarnya aktivitas protease yang dihasilkan. Isolat PP-7 tidak dipilih untuk seleksi berikutnya dikarenakan aktivitas protease pada isolat ini rendah. Pembentukan zona bening dan aktivitas protease pada waktu inkubasi 24 dan 48 jam ini dilakukan sebagai seleksi untuk memperoleh isolat bakteri yang memiliki kemampuan proteolitik yang tinggi. Isolat PP-1 dan isolat PP-4 dipilih untuk seleksi selanjutnya berdasarkan pengujian aktivitas protease dan pembentukan diameter zona bening terbesar.

Menurut Enggel *et al.*, (2004) tinggi rendahnya aktivitas enzim protease dipengaruhi oleh pH, konsentrasi, suhu dan substrat. pH tinggi maupun rendah akan menurunkan aktivitas enzim karena sebagian besar enzim bekerja optimum pada pH netral. Suhu optimum enzim tergantung dari asal enzim tersebut, misalnya enzim mesofilik optimum pada suhu antara 25-40 °C, sedangkan enzim termofilik bekerja optimum pada suhu di atas 40 °C.

#### 4.2 Karakteristik Pertumbuhan Isolat Proteolitik Terpilih

Isolat bakteri proteolitik yaitu PP-1 dan PP-4 dilakukan karakterisasi meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, uji

katalase, uji oksidase, dan uji patogenisitas. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri yang didapatkan dari hasil isolasi merupakan bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif merupakan bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal dan akan terwarnai ungu ketika dilakukan pewarnaan Gram.

Bakteri Gram negatif adalah bakteri dengan lapisan peptidoglikan yang tipis dan kebanyakan anggota dari bakteri Gram negatif adalah patogen atau bakteri yang mampu menyebabkan penyakit pada inang. Isolat PP-1 merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk kokus atau bulat dengan tidak adanya endospora berdasarkan hasil pewarnaan Gram dan endospora. Sedangkan bakteri PP-4 merupakan bakteri Gram positif yang menunjukkan adanya endospora pada pewarnaan endospora. Karakter pengujian karakteristik isolat ditunjukkan pada Tabel 4.3.

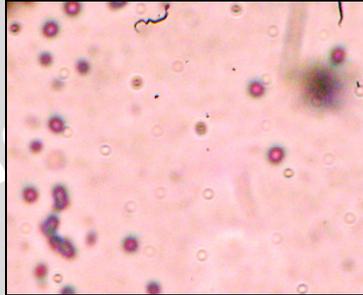
Tabel 4.3 Karakter pertumbuhan isolat terpilih

No.	Karakteristik	Nama Isolat	
		PP-1	PP-4
1.	Gram	negatif	positif
2.	Endospora	-	+
3.	Bentuk sel	kokus/ bulat	basil pendek/ batang
4.	Katalase	+	+
5.	Oksidase	-	+
6.	Hidrolisis Protein	+	+
7.	Patogenisitas	+	-
8.	Panjang sel	1 $\mu\text{m}$	2,5 $\mu\text{m}$

Keterangan : + reaksi positif ; - reaksi negatif

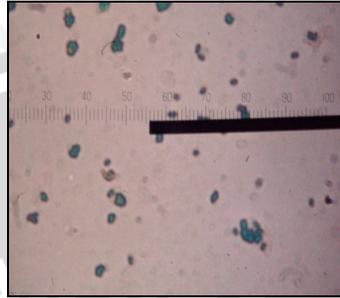
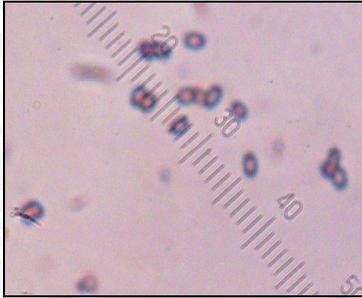
Bakteri PP-1 merupakan bakteri Gram negatif berbentuk kokus atau bulat sedangkan bakteri PP-4 merupakan Gram positif dengan bentuk basil pendek. Bakteri Gram positif merupakan kelompok bakteri yang memiliki lapisan peptidoglikan sebanyak 50% dari dinding sel. Peptidoglikan merupakan senyawa kompleks yang terdiri dari tiga bagian, yaitu *backbone* (N-acetyl glukosamine dan N-acetylmuramic acid) secara berseling, sekelompok rantai tetra peptida identik yang melekat pada N-acetylmuramic acid dan

sekelompok *identical peptide-cross bridges*. Kelompok bakteri ini memiliki senyawa khusus yaitu *teichoic* dan *teichuronic acid* sebanyak 50% dari berat kering dinding sel (Brooks dan Stephen, 2005).



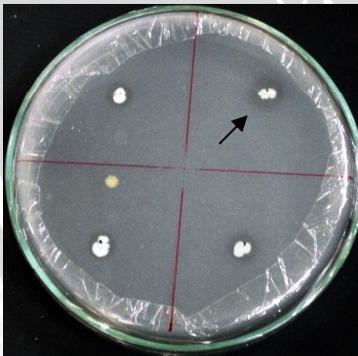
Gambar 4.1 Hasil pewarnaan Gram isolat PP-1, Gram negatif , bentuk kokus, panjang sel satu  $\mu\text{m}$  dan dengan tidak adanya endospora (1000x)

Bakteri Gram negatif tidak memiliki senyawa khusus seperti bakteri Gram positif dan memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis. Isolat bakteri PP-4 merupakan salah satu bakteri yang termasuk genus *Bacillus* yang memiliki bentuk sel basil berdasarkan karakteristik pertumbuhannya. Menurut Gupta (2002) bakteri proteolitik penghasil protease berasal dari golongan *Bacillus*, diantaranya adalah *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, dan *Bacillus liceniformis* yang merupakan bakteri Gram positif. Bakteri proteolitik Gram negatif berasal dari golongan *Streptococcus*, diantaranya *S. bovis* dan *S. faecium*. Uji biokimia dilakukan pada isolat bakteri proteolitik yang terpilih untuk mengetahui karakter biokimiawi seperti dihasilkannya enzim tertentu. Karakter biokimiawi ini dapat menjadi pembeda antara kedua isolat. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat yang diuji dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransinya terhadap oksigen.

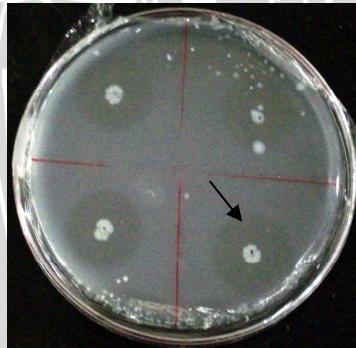


Gambar 4.2 Hasil pewarnaan Gram isolat PP-4, Gram positif, bentuk basil pendek, panjang sel 2,5  $\mu\text{m}$ , dengan adanya endospora (1000x)

Menurut Alexander dan Strete (2001) bakteri memproduksi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) selama respirasi aerob. Hidrogen peroksida jika terakumulasi di dalam sel, maka akan menyebabkannya menjadi toksik. Sebagian besar bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif menghasilkan enzim katalase untuk alasan ini. Enzim ini dapat memecah  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi air dan oksigen. Oksigen menyebabkan timbulnya gelembung sesaat setelah penetesan  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada isolat yang mengindikasikan hasil tes positif. Isolat bakteri PP-1 dan PP-4 menunjukkan uji katalase positif sehingga keduanya memiliki karakter tumbuh aerob atau anaerob fakultatif.



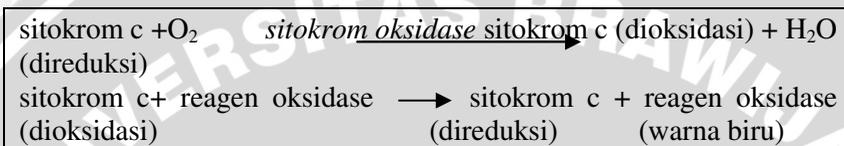
a.



b.

Gambar 4.3 Pembentukan zona bening isolat terpilih a. isolat PP-1 dan b. isolat PP-4

Uji oksidase dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim oksidase. Menurut Pollack dkk. (2005) rantai transpor elektron adalah serangkaian reaksi yang menunjukkan langkah akhir dari respirasi sel bakteri. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim sitokrom oksidase. Sitokrom oksidase mengoksidasi molekul-molekul transpor elektron (sitokrom c) yang mereduksi oksigen untuk membentuk air pada tahap akhir. Mekanisme reaksi tersebut ditunjukkan pada diagram di bawah ini



Gambar 4.4 Diagram uji oksidase

Kedua isolat yang diuji menunjukkan karakter oksidase positif pada isolat PP-4 dengan perubahan warna *Bactident Oxidase Kit* menjadi biru tua beberapa saat setelah penggosokan isolat. Sedangkan isolat PP-1 menunjukkan reaksi negatif dengan tidak adanya perubahan warna. Isolat bakteri PP-1 menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk bakteri patogen, hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media *Blood Agar* (BAP).

Media *Blood Agar* merupakan media yang kaya akan nutrisi untuk pertumbuhan bagi semua jenis bakteri. Bakteri tertentu mampu memproduksi enzim hemolysin yang bereaksi dengan sel darah merah untuk melisis dan memecah sel darah merah. Hemolisis terbagi menjadi hemolisis α, hemolisis β dan hemolisis γ. Hemolisis total ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terlihat pada isolat bakteri PP-1. Bakteri tersebut memiliki enzim hemolysin yang mampu memecah sel darah merah secara total yang menunjukkan hemolisis β. Zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteri tersebut patogen. Isolat bakteri PP-4 yang ditumbuhkan pada media *Blood Agar* tidak menunjukkan adanya zona bening. Hemolisis pada bakteri ini termasuk hemolisis γ, yaitu tidak mampu menghemolisis darah, bakteri ini tidak bereaksi dengan sel darah merah dan tidak merubah warna media sehingga bakteri ini bukan termasuk bakteri patogen (Port, 2008).

Hemolisis darah pada media *blood agar* (BAP) dapat diamati setelah inkubasi empat hari. Hal ini dikarenakan proses produksi  $\beta$ -lisin belum terlihat sempurna pada inkubasi kurang dari empat hari. Enzim  $\beta$ -lisin yang diproduksi oleh bakteri sangat sensitif terhadap eritrosit darah dan menyebabkan permukaan dinding eritrosit menjadi kering. Hemolysin terbentuk seiring dengan waktu pertumbuhan bakteri, hal ini menunjukkan bahwa hemolysin merupakan substansi intraseluler yang diproduksi setelah waktu pertumbuhan maksimum tercapai. Hemolisis digunakan untuk mendeteksi karakteristik bakteri terutama golongan *Streptococci*, dimana hemolysin yang diproduksi berkaitan erat dengan virulensi atau patogenisitas (Arimi *et-al.*, 1990).



Gambar 4.5 Uji patogenisitas pada media *Blood Agar* (BAP) a. isolat bakteri PP-1 dan b. isolat bakteri PP-4

Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri PP-1 menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk bakteri patogen, meskipun memiliki aktivitas enzim yang tertinggi. Uji patogenisitas ini merupakan seleksi terakhir bakteri proteolitik untuk uji selanjutnya. Isolat bakteri PP-4 dipilih untuk uji selanjutnya berdasarkan hasil uji patogenisitas tersebut.

#### 4.3 Penentuan Konsentrasi Tepung Bungkil Kedelai untuk Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Konsentrasi tepung bungkil kedelai ditentukan untuk mengetahui konsentrasi tepung bungkil kedelai yang menghasilkan jumlah sel bakteri yang lebih banyak. Derajat keasaman (pH) media disesuaikan

dengan pH optimal pertumbuhan isolat bakteri pada media *Calcium Caseinate Agar* dan *Calcium Caseinate Broth* yaitu pH 6,8. Jumlah sel bakteri PP-4 diamati pada inkubasi 24 jam suhu 37 °C pada media tepung bungkil kedelai cair (*broth*) dengan konsentrasi satu dan dua persen ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Jumlah sel bakteri PP-4 pada berbagai konsentrasi

Nama Isolat	Jumlah sel rata-rata (sel/ml)	
	Konsentrasi 1%	Konsentrasi 2%
PP-4	$3,87 \times 10^7$	$6,27 \times 10^7$

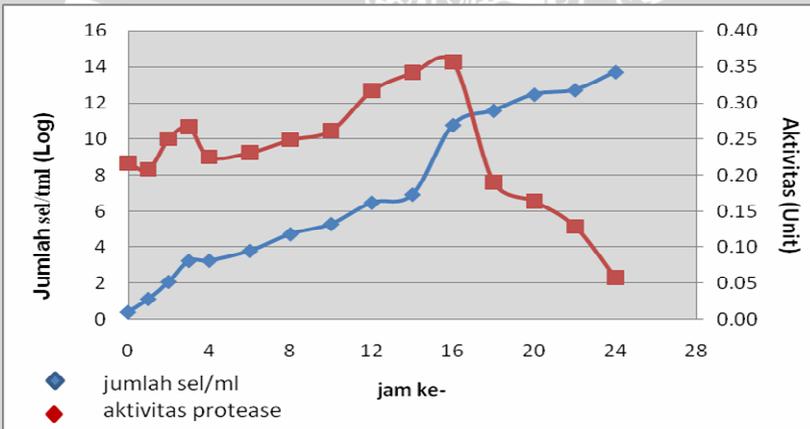
Isolat bakteri PP-4 mampu tumbuh baik pada konsentrasi tepung bungkil kedelai sebesar dua persen dibandingkan dengan konsentrasi satu persen, yaitu dengan jumlah sel sebesar  $6,27 \times 10^7$  sel/ml. Hasil ini dijadikan sebagai acuan untuk pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dan uji aktivitas protease isolat PP-4 pada media tepung bungkil kedelai cair (*broth*). Aktivitas protease dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, yaitu substrat tepung bungkil kedelai, dimana jumlah sel yang tertinggi terdapat pada konsentrasi tepung bungkil kedelai yang lebih tinggi pula. Jumlah sel yang tinggi berpengaruh terhadap enzim yang dihasilkan. Menurut Manivannan dan Kathiresa (2007) konsentrasi enzim berbanding lurus dengan efektivitas kerja enzim. Semakin tinggi konsentrasi maka kerja enzim akan semakin tinggi dan cepat.

#### 4.4 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat PP-4 pada media *Calcium Caseinate Broth* (CCB)

Kurva pertumbuhan isolat bakteri PP-4 dibuat pada media CCB yaitu untuk mengetahui karakter tumbuh dari isolat bakteri tersebut sebelum dilakukan aplikasi pertumbuhan pada media tepung bungkil kedelai. Kurva pertumbuhan diamati setiap dua jam hingga fase stationer. Sampel bakteri diambil untuk kurva pertumbuhan dan untuk mengetahui aktivitas protease dari bakteri PP-4 berdasarkan titik pengambilan sampel dari kurva pertumbuhan. Aktivitas protease diuji untuk mengetahui fase pemanenan aktivitas tertinggi enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri PP-4.

Aktivitas protease diuji dengan menggunakan kasein sebagai substrat. Enzim protease yang disekresi oleh sel bakteri akan menghidrolisis kasein untuk menghasilkan asam amino. Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein yang dapat diukur dari nilai kerapatan sel (*optical density*) (Susanti, 2003). Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri PP-4 yang dilakukan pada media *Calcium Caseinate Broth* ditunjukkan pada Gambar 4.6.

Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri PP-4, menunjukkan bahwa isolat bakteri ini memiliki waktu inkubasi pertumbuhan antara 16 sampai 22 jam. Hal ini dapat diketahui yaitu pada jam ke 16 merupakan awal fase stationer. Jumlah sel bakteri tidak mengalami peningkatan yang cukup signifikan pada fase stationer dan disertai dengan menurunnya aktivitas protease yang dihasilkan.



Gambar 4.6 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Bakteri PP-4 pada Media CCB

Kurva pertumbuhan di atas tidak menunjukkan adanya fase lag, karena jumlah sel telah mengalami peningkatan secara signifikan pada jam ke-0 hingga jam ke-14 yang menunjukkan bahwa fase tersebut merupakan fase logaritmik. Jumlah sel bakteri pada kurva pertumbuhan meningkat diikuti oleh peningkatan aktivitas protease yang dihasilkan. Akhir fase logaritmik ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah sel secara signifikan pada jam ke 14 sampai jam

ke 16. Aktivitas protease tertinggi terdapat pada akhir fase logaritmik yaitu pada jam ke 16 yang juga menunjukkan puncak peningkatan jumlah sel, berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi terjadi pada akhir fase logaritmik. Aktivitas enzim bakteri PP-4 pada media CCB tidak sebanding dengan peningkatan jumlah sel bakteri seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas protease menurun dari jam ke 16-22, dikarenakan aktivitas protease maksimum telah dicapai yaitu pada jam ke 16. Aktivitas protease mencapai nilai optimum sebesar 0,357 Unit pada akhir fase logaritmik.

Aktivitas protease menurun drastis ketika aktivitas protease tertinggi telah dicapai dan pertumbuhan bakteri mengalami fase stationer. Hal ini dikarenakan enzim telah jenuh oleh substrat, meskipun jumlah sel bakteri masih mengalami peningkatan. Kompleks enzim yang terbentuk tidak sebanding dengan bertambahnya waktu inkubasi sehingga aktivitas protease menurun. Aktivitas protease menurun pada jam ke 18 dengan nilai aktivitas sebesar 0,190 Unit. Hal ini dikarenakan jumlah sel bakteri sudah tidak mengalami peningkatan yang cukup signifikan dan jumlah sel hidup lebih sedikit dibandingkan sel mati serta. Aktivitas protease yang dihasilkan terhambat disebabkan semakin banyaknya zat-zat toksik yang dihasilkan oleh sisa-sisa sel bakteri tersebut. Jumlah sel dan aktivitas protease memiliki korelasi lemah. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas protease tidak hanya dipengaruhi oleh peningkatan maupun penurunan jumlah sel tetapi terdapat faktor-faktor lain diantaranya konsentrasi substrat, suhu dan pH optimum aktivitas enzim.

#### **4.5 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat PP-4 pada Media Tepung Bungkil Kedelai**

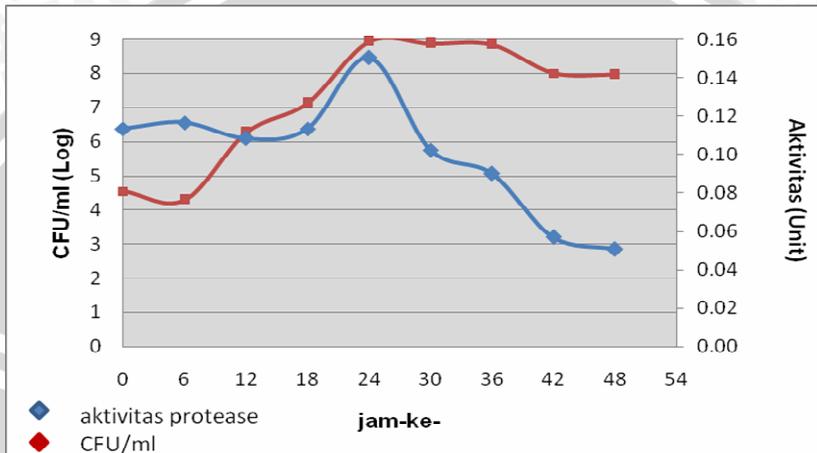
Tepung bungkil kedelai yang digunakan sebagai media produksi merupakan proses adaptasi isolat bakteri proteolitik terpilih yaitu PP-4 terhadap media pakan burung puyuh. Isolat bakteri PP-4 diharapkan mampu menghidrolisis protein yang terdapat pada media pakan tersebut. Kurva pertumbuhan tidak diamati menggunakan metode spektrofotometri melainkan *total plate count* (TPC) atau

penghitungan koloni bakteri. Hal ini dikarenakan media tepung bungkil kedelai memiliki kandungan protein yang tinggi sehingga terdapat endapan pada suspensi media. Endapan tersebut dapat mengganggu pengukuran nilai absorbansi karena kekeruhan media tidak hanya dikarenakan adanya bakteri akan tetapi adanya agregat atau endapan pada media tepung bungkil kedelai. Aktivitas protease diukur berdasarkan titik pengambilan sampel kurva pertumbuhan, yaitu untuk mengetahui aktivitas protease tertinggi isolat bakteri PP-4 pada media tepung bungkil kedelai. Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease ditunjukkan pada Gambar 4.7.

kurva pertumbuhan dibuat untuk mengetahui waktu atau fase yang tepat untuk produksi protease sehingga diperoleh enzim yang memiliki aktivitas tertinggi dalam jumlah yang optimum. Kurva pertumbuhan bakteri PP-4 (Gambar 4.7) menunjukkan bahwa fase lag terjadi pada jam ke 0-6 kemudian dilanjutkan dengan penambahan jumlah sel atau fase logaritmik pada jam ke 6-24. Fase awal (lag) merupakan fase terjadinya sintesis enzim oleh sel yang digunakan untuk metabolisme metabolit. Fase ini merupakan fase adaptasi bagi bakteri terhadap lingkungan pertumbuhan untuk mensekresikan enzim-enzim ekstraselular yang akan menghidrolisis komponen medium yang diperlukan untuk metabolisme dan pertumbuhan sel.

Fase ini kemudian dilanjutkan dengan reproduksi selular. Konsentrasi selular meningkat perlahan-lahan hingga pada laju pertumbuhan mencapai titik maksimal dan terjadi pertumbuhan logaritmik atau eksponensial. Aktivitas protease juga mengalami peningkatan pada jam ke 24. Aktivitas protease pada fase awal pertumbuhan meningkat secara fluktuatif hingga jam ke 18. Aktivitas protease kemudian mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan jumlah sel. Hal ini merupakan adaptasi isolat bakteri PP-4 terhadap media tepung bungkil kedelai. Menurut Suharni dkk. (2008) fase adaptasi berjalan lambat disebabkan beberapa hal, diantaranya pemindahan kultur ke dalam media yang nutrisinya terbatas, dan penyesuaian bakteri terhadap lingkungan. Hubungan korelasi antara jumlah sel dan aktivitas protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri PP-4 merupakan korelasi lemah. Hubungan ini menunjukkan bahwa aktivitas protease tidak hanya dipengaruhi oleh

peningkatan jumlah sel atau tidak terdapat hubungan antara jumlah sel dengan aktivitas protease. Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas protease yang mengalami penurunan setelah tercapai inkubasi optimum aktivitas protease pada jam ke-24.



Gambar 4.7 Kurva Pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri PP-4 pada media tepung bungkil kedelai

Aktivitas protease mengalami peningkatan pada jam ke 24 sesuai dengan pertumbuhan bakteri dimana fase logaritmik pertumbuhan bakteri PP-4 telah tercapai (jumlah sel tertinggi). Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas protease dipengaruhi oleh waktu inkubasi dan jumlah sel bakteri yang terdapat dalam media. Aktivitas protease tertinggi ditunjukkan pada jam ke 24 yang merupakan akhir fase logaritmik yaitu sebesar 0,150 Unit. Jovensly *et al.* (2002) menemukan bahwa tingkat aktivitas protease tertinggi diketahui pada inkubasi 24 jam yang ditunjukkan oleh *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*. Aktivitas protease menurun secara drastis pada jam ke 30 dan cenderung konstan pada fase stationer sampai jam ke 36.

Aktivitas protease menurun dari 0,150 Unit pada jam ke 24 menjadi 0,102 Unit pada jam ke 30 menunjukkan bahwa enzim telah mencapai waktu inkubasi maksimum. Oleh karena itu aktivitas protease tidak akan mengalami peningkatan karena enzim telah

berikatan dengan substrat dan sudah tidak terdapat enzim bebas atau telah jenuh oleh substrat pada waktu fase tersebut, dimana jumlah koloni bakteri yang hidup tidak mengalami peningkatan secara signifikan. Jumlah sel bakteri yang terdapat dalam media tidak mempengaruhi peningkatan maupun penurunan aktivitas enzim yang diproduksi oleh bakteri tersebut ketika substrat telah habis.

Aktivitas protease pada jam ke 30-48 menurun secara drastis dimana pada kurva pertumbuhan juga telah mengalami penurunan jumlah koloni atau *death phase*. Hal ini dimungkinkan aktivitas protease menurun setelah tercapai waktu inkubasi optimum, karena produksi enzim terhambat oleh berkurangnya nutrisi yang terdapat dalam media. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh mengalami penurunan disebabkan senyawa atau nutrisi yang dibutuhkan oleh sel bakteri mendekati habis dan mengalami penumpukan-penumpukan produk penghambat, maka terjadi penurunan laju pertumbuhan bakteri tersebut. Aktivitas protease pada waktu inkubasi 30-48 menunjukkan bahwa bakteri tersebut sudah tidak mampu memproduksi enzim protease karena jumlah sel dan substrat yang terdapat dalam media telah menurun.

Fase penurunan ditandai dengan berkurangnya jumlah sel hidup (*viable*) dalam media karena terjadi kematian, sehingga koloni bakteri yang tumbuh juga menurun. Menurut Yuratmoko *et-al.* (2007) waktu inkubasi merupakan waktu yang diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Semakin lama waktu inkubasi semakin tinggi aktivitas enzim hingga dicapai waktu inkubasi optimum. Banyaknya enzim yang berikatan dengan substrat menyebabkan produk yang dihasilkan semakin banyak dan aktivitas enzim semakin menurun. Aktivitas protease akan menurun ketika waktu inkubasi optimum telah tercapai. Autolisis pada protease memengaruhi terjadinya penurunan aktivitas protease. Jumlah substrat yang dihidrolisis oleh protease ekstraselular dalam media juga memengaruhi penurunan aktivitas protease setelah waktu inkubasi optimum tercapai.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Isolasi bakteri proteolitik dari usus burung puyuh menghasilkan enam isolat bakteri yaitu PP-1, PP-2, PP-4, PP-5, PP-7 dan PP-9. Keseluruhan bakteri tersebut memiliki kemampuan protease yang ditunjukkan dengan pembentukan zona bening dan uji aktivitas protease. Selanjutnya dipilih isolat PP-4 berdasarkan deteksi kemampuan proteolitik, aktivitas protease tinggi dan bersifat nonpatogen. Bakteri PP-4 memiliki aktivitas protease tertinggi 0,357 Unit pada fase akhir logaritmik yaitu jam ke 16 pada media selektif *Calcium Caseinate Broth* dengan densitas sel sebesar  $1,08 \times 10^8$  sel/ml. Isolat bakteri PP-4 mampu tumbuh pada media mengandung dua persen tepung bungkil kedelai dengan jumlah populasi  $8,57 \times 10^8$  cfu/ml. Aktivitas protease tertinggi diperoleh pada jam ke 24 dengan aktivitas protease sebesar 0,150 Unit yang menunjukkan puncak aktivitas protease tertinggi terjadi pada akhir fase logaritmik.

#### **5.2 Saran**

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan uji konsorsium dari isolat bakteri yang didapatkan dengan karakteristik nonpatogen dan mampu tumbuh bersama pada media untuk memperoleh nilai aktivitas protease yang lebih besar. Perlu dilakukan identifikasi bakteri PP-4 sampai ke spesies serta purifikasi enzim protease untuk mendapatkan ekstrak enzim yang murni.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abun. 2008. Hubungan **Mikroflora dengan Metabolisme dalam Saluran Pencernaan Unggas dan Monogastrik**. Universitas Padjajaran. Jatinangor
- Adams, A.C. 2000. Enzim Komponen Penting dalam Pakan Bebas Antibiotik. Agritekno Primaneka. [http://agritekno.tripod.com/enzim\\_komponen\\_penting .htm](http://agritekno.tripod.com/enzim_komponen_penting.htm) Tanggal Akses 07 Januari 2009.
- Alexander, S.K dan D. Strete. 2001. **Microbiology. A photographic Atlas for the Laboratory**. Addison Wesley Logman, Inc. New York.
- Arimi, S.M., R.W.A Park and C.R Fricker. 1990. Study of Haemolytic Activity of Some *Campylobacter* spp. on Blood Agar Plate. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 384-389.
- Benson, H. 2002. **Microbiological Application Manual in General Microbiology Eight Edition**. Mc.Graw Hill. Boston.
- Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV, Srinivasan MC. 1995. Thermostability of High Activity Alkaline Protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). *Enzyme Microbiol Technol* 17: 136-139.
- Brooks, G.F. Janet, S. dan A. Stephen, 2005. **Mikrobiologi Kedokteran**. Salemba medika. Jakarta.
- Dybkaer R. 2001. Unit "katal" for catalytic activity. *J Pure Appl Chem* 73:927-931.
- Diwan, J.J. 2005. Introduction to The Protease. [Http://Delphipys.univ-tours.fr/prolys/intro protease.html](http://Delphipys.univ-tours.fr/prolys/intro_protease.html). Tanggal Akses 23 Januari 2005.

- Downes and Ito (ed.). 2001. Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association. Washington D.C.
- El-safey, E. M dan U. M. Abdul, R. 2004. Production, Purification, and Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis*. Botany and Microbiology department, Faculty of sciences, Al-Azhar University. March (23-25).p.14.
- El-Safey E. M. and Ammar M.S. 2002. Amylase Production Using Nile Hyacinth Under Solid State Fermentation (SSF) Conditions. Int. Conf. for Develop. And The Env. In the Arab World. Assiut Univ. March 26-28, pp. 101-113.
- Enggel J, Meriandini A dan Natalia L, 2004. Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 9(1): 9–12.
- Fardiaz, S.1993. **Analisis Mikrobiologi Pangan**. PT.Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Fardiaz, Srikandi. 2000. **Mikrobiologi Pangan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB.Bogor.
- Fitriah, I.V.2003.Uji Potensi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tahu dalam Pembuatan Minyak Kelapa secara Fermentasi. Jurusan Biologi.FMIPA.Universitas Brawijaya.Malang.
- Gupta, R., Beeg QK, Loranz P., 2002. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular approaches and Industrial Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59(1):15-32.
- Jajo.66.2008. Bungkil Kedelai Bahan Baku Pakan SNI 01-4227-1996. snibungkil-kedelai.pdf. Tanggal Akses 9 September 2008.

Johnson, M.T.2001. **Hemolysis on Blood Agar**.Indiana University School of Medicine.India.

Johnvesly B.; Manjunath B. R., and Naik G. R. 2002. Pigeon Pea Waste as Anovel, Inexpensive, Substrate for Production of a Thermostable Alkaline Protease from Thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. Bioresour Technol.82(1):61-4.

Kunta. 2007. Ilmu Pakan dan Nutrisi Hewan. <http://kunta02.multiply.com/journal/item/5>.Tanggal Akses 9 September 2008.

Madigan, M.T., J.H Martinko, J. Parker. 2003. **Brock Biology of Microorganism, Tenth Edition**. Pearson Education, Inc. USA.

Manivannan and Khatiresan.2007.Alkaline Protease Production by *Penicillium fellutanum* Isolated from Mangrove Sediment. International Journal Of Biology Chemistry, 1(2):98-103.

Mastika, I. M. 2000. **Ilmu Nutrisi Unggas**. Penerbit Universitas Udayana. Denpasar.

Mitsouka, Tomotari. 1990. **A Profile of Intestinal Bacteria**. Yakult Honsha Co.Ltd. Tokyo.

Mubarik NR, Suwanto A dan Suhartono MT, 2000. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ektraseluler dari Isolat Bakteri Termofilik Ekstrim. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta. 151–158.

Murni, R., Suparjo, Akmal, dan B.L.Ginting. 2008.Pemanfaatan Limbah sebagai Pakan Ternak. Laboratorium Makanan Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Jambi/03. Pemanfaatan. pdf.

- Naiola, E. dan Nunuk W. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp. Berk. Penelitian Hayati: 13(51-56).
- Nelson and Cox. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed.** <http://www.zieglerm@u.arizona.edu>. Tanggal Akses 12 November 2009
- Patria, Bhina.2008.Analisis Deskriptif.<http://www.inparametric@yahoo.com>. Tanggal Akses 5 Agustus 2009.
- Pollack, R. A., L. Findlay, W. Mondschein, R. R. Modesto. 2005. **Laboratory Exercises in Microbiology.** John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Port, Tami.2008. Blood Agar (BAP) Bacterial Growth Medium Differential Medium to Identify B-hemolytic *Streptococcus*. <http://suite-101.com/BAP>. Tanggal Akses 20 Juni 2009.
- Pusri.2000.Pakan Ternak. [http://www.pusri.co.id/budidaya/peternakan/pakan\\_ternak.pdf](http://www.pusri.co.id/budidaya/peternakan/pakan_ternak.pdf).Tanggal Akses 9 September 2008.
- Secades P, and Guijarro J. A. 1999. Purification and characterization of anextracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl Environ Microbiol. 65(9):3969-3975.
- Siregar, Z dan Edhi, M. 2004.Evaluasi Pemanfaatan Tepung Bungkil Kedelai dan Bungkil Kelapa Sawit Difermentasi *Aspergillus niger* Hidrolisat Tepung Bulu Ayam dan Suplementasi Mineral Zn dalam Ransum Ayam Pedaging.Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara.
- Sitompul, Saulina.2004.Analisis Asam Amino dalam Tepung Ikan dan Tepung Bungkil Kedelai. Buletin Teknik Pertanian vol 9, Nomor 1.

Solikah, Khusnul.2009. Potensi Bakteri Proteolitik Indigenous Mangrove dalam Dekomposisi Limbah Tambak Udang. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya.Malang.

Suharni T.T., S.J. Nastiti, A.E.S. Soetarto. 2008. **Mikrobiologi Umum**. Penerbit Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Suhartono, M.T.1989. **Enzim dan Bioteknologi**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan DirJen Pendidikan IPB.Bogor.

Suryanti, Indah.2001. Pengaruh Komposisi Media terhadap Aktivitas Protease *Bacillus* sp.Jurusan Biologi FMIPA. Malang.Skripsi. 47 hal.

Susanti, Elvi. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15.Biodiversitas, Volume 4, Nomor 1.

Trevor P, 1991. **Understanding Enzyme, 3rd ed**. Elis Harwood. New York. 306–307.

Widyakusuma, D. 2007. Potensi Konsorsium Strain-Strain Bakteri Anggota *Pseudomonas* Pembentuk Biofilm Dalam Mendegradasi *Linear Alkylbenzene Sulfonate (Las)*. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.

Winarno, F. G. 1983. **Enzim Pangan**. Penerbit PT. Gramedia. Jakarta.

Yamin, M. dan Neltje, N.P.2007.Aktivitas Enzim Protease dan Kondisi Pencernaan Ternak setelah Pemberian Pakan.<http://www.rcaprb.com/UserFiles/File/JRA.protease.pdf>. Tanggal Akses 12 Desember 2008.

Yuratmoko, D., Nisa, R.M., and Anja, M. 2007. Screening of Proteolytic Enzymes of *Streptomyces* sp. Local Strain And Their Characterization. MICROBIOLOGY INDONESIA. ISSN1978-3477, p 69-73

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## LAMPIRAN

### 1. Komposisi Media

- Media CCB (*Calcium Caseinate Broth*) modifikasi ( g/L)  
(Pronadisa, 2009):
  - *Bacto peptone* 5
  - *meat extract* 3
  - NaCl 5
  - Casein 2,5
  - Ca(OH)<sub>2</sub> 0,15
  - CaCl<sub>2</sub> 0,05
  - Aquades

Pembuatan media *Calcium Caseinate Agar* dilakukan dengan menambahkan *Bacto Agar* sebanyak 13,5 g/L.

- Media *Blood Agar* (Merck) (g/L):
  - Substrat (ekstrak hati dan pepton) 20
  - Sodium Klorida 5
  - Agar 15
  - pH  $6,8 \pm 0,2$
  - media ditambah 5-8% darah domba

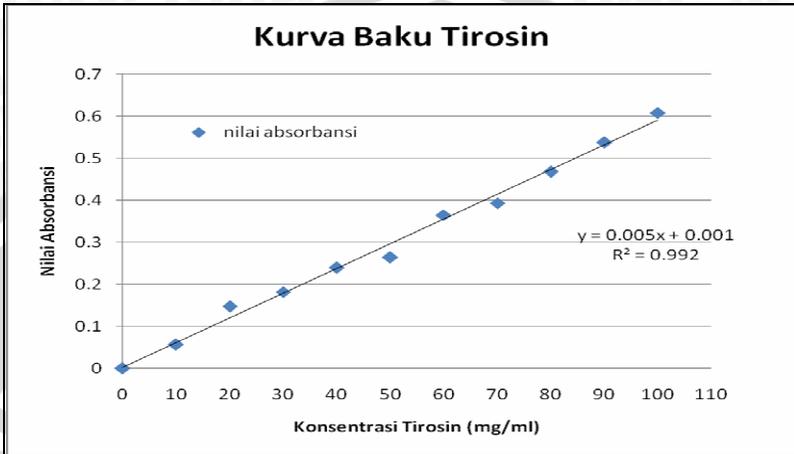
- Media *Soybean meal broth* (g/L) :
  - Tepung bungkil kedelai 20
  - Aquades

Pembuatan media *Soybean meal Agar* dilakukan dengan menambahkan *Bacto Agar* sebanyak 13,5 g/L.

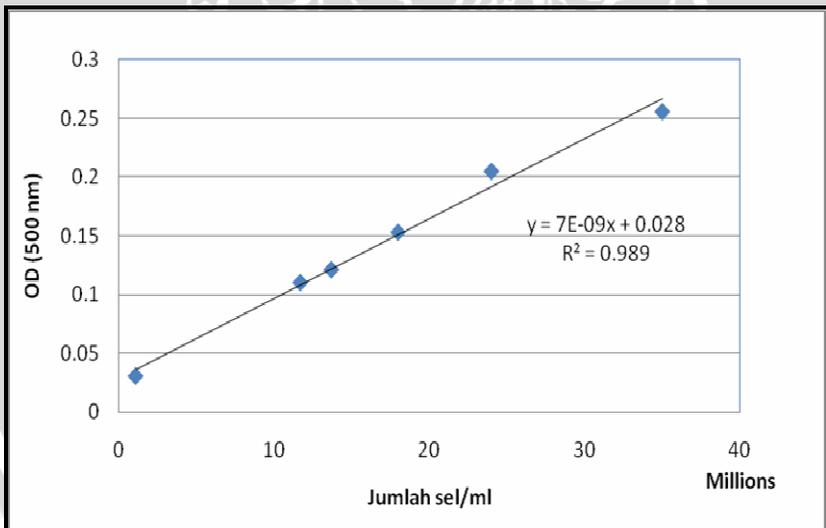
### 2. Komposisi Reagen Uji Aktivitas Enzim Protease

- substrat casein dua persen dalam buffer fosfat
- buffer fosfat pH 7
- 0,4 M Trichloro acetic acid (TCA)
- Tris HCl
- Aquades steril

### 3. Kurva Baku Tirosin



### 4. Kurva Standar pada media *Calcium Caseinate Broth*



## 5. Hasil Pewarnaan Gram dan Pewarnaan Endospora

Karakter morfologi	PP-1	PP-2	PP-4	PP-5	PP-7	PP-9
Gram	negatif	positif	positif	positif	negatif	positif
Bentuk	coccus	Basil pendek	Basil pendek	Basil pendek	Coccus berantai	Basil pendek
Endospora	Tidak ada	Positif/ada	Positif/ada	Tidak ada	Tidak ada	Positif/ada
Patogenisitas	positif	negatif	negatif	positif	negatif	negatif
Panjang sel ( $\mu\text{m}$ )	1	2	2,5	2	2	3

## 6. Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease

### Data Seleksi 24 jam

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
PP-1	3	0,87133	0,001528	0,000882	0,86754	0,87513	0,870	0,873
PP-2	3	0,00600	0,001000	0,000577	0,00352	0,00848	0,005	0,007
PP-4	3	0,38567	0,000577	0,000333	0,38423	0,38710	0,385	0,386
PP-5	3	0,15967	0,000577	0,000333	0,15823	0,16110	0,159	0,160
PP-7	3	0,12133	0,000577	0,000333	0,11990	0,12277	0,121	0,122
PP-9	3	0,04667	0,001155	0,000667	0,04380	0,04954	0,046	0,048
Total	18	0,26511	0,305448	0,071995	0,11322	0,41701	0,005	0,873

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,586	5	0,317	335871,200	0,000
Within Groups	0,000	12	0,000		
Total	1,586	17			

### Uji Lanjutan Duncan's

jenis_isolat	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
PP-2	3	0,00600					
PP-9	3		0,04667				
PP-7	3			0,12133			
PP-5	3				0,15967		
PP-4	3					0,38567	
PP-1	3						0,87133
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Data Seleksi 48 jam

Jenis isolat	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
PP-1	3	0,20167	0,001155	0,000667	0,19880	0,20454	0,201	0,203
PP-2	3	0,07300	0,001000	0,000577	0,07052	0,07548	0,072	0,074
PP-4	3	0,05633	0,000577	0,000333	0,05490	0,05777	0,056	0,057
PP-5	3	0,10100	0,001000	0,000577	0,09852	0,10348	0,100	0,102
PP-7	3	0,17733	0,000577	0,000333	0,17590	0,17877	0,177	0,178
PP-9	3	0,13267	0,000577	0,000333	0,13123	0,13410	0,132	0,133
Total	18	0,12367	0,054226	0,012781	0,09670	0,15063	0,056	0,203

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,050	5	0,010	13840,431	0,000
Within Groups	0,000	12	0,000		
Total	0,050	17			

### Uji Lanjutan Duncan's

jenis_isolat	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
PP-4	3	0,05633					
PP-2	3		0,07300				
PP-5	3			0,10100			
PP-9	3				0,13267		
PP-7	3					0,17733	
PP-1	3						0,20167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### 7. Korelasi antara Jumlah Sel dan Aktivitas Enzim Protease pada Media *Calcium Caseinate Broth* (CCB).

		jumlah sel/ml	Unit(U)
jumlah sel/ml	Pearson Correlation	1	-0,370(*)
	Sig. (2-tailed)		0,012
Unit(U)	Pearson Correlation	-0,370(*)	1
	Sig. (2-tailed)	0,012	

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

a Listwise N=45  
negative correlation of two variabel

### 8. Korelasi antara Jumlah Sel dan Aktivitas Enzim Protease pada Media Tepung Bungkil Kedelai

		jumlah sel/ml	Unit(U)
jumlah sel/ml	Pearson Correlation	1	0,342
	Sig. (2-tailed)		0,081
Unit(U)	Pearson Correlation	0,342	1
	Sig. (2-tailed)	0,081	

a Listwise N=27  
no correlation of two variabel

## 9. SKEMA KERJA

