

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil Analisa Kurva Pertumbuhan *Bacillus firmus*

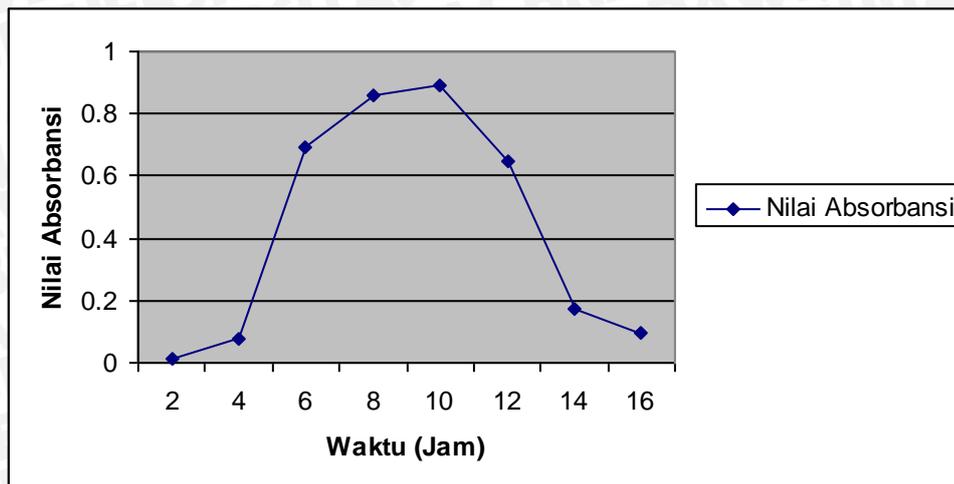
Analisa yang dilakukan pada kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus firmus* ini menggunakan tiga perlakuan yang berbeda yaitu *Optical Density* dengan spektrofotometer 275 nm, dan hitungan langsung dengan Haemocytometer. Alat spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 3. Perlakuan yang berbeda ini bertujuan mendapatkan perbandingan untuk memperoleh hasil yang lebih maksimal. Data hasil analisa *Optical Density* dengan spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 4.

Tabel 1. Data Hasil Analisa Optical Densitas dengan Spektrofotometer

Jam	Nilai Absorbansi
2	0,010
4	0,074
6	0,690
8	0,858
10	0,888
12	0,649
14	0,175
16	0,093



Gambar 3. Alat Spektrofotometer



**Gambar 4. Hasil Analisa Optical Densitas Dengan Spektrofotometer**

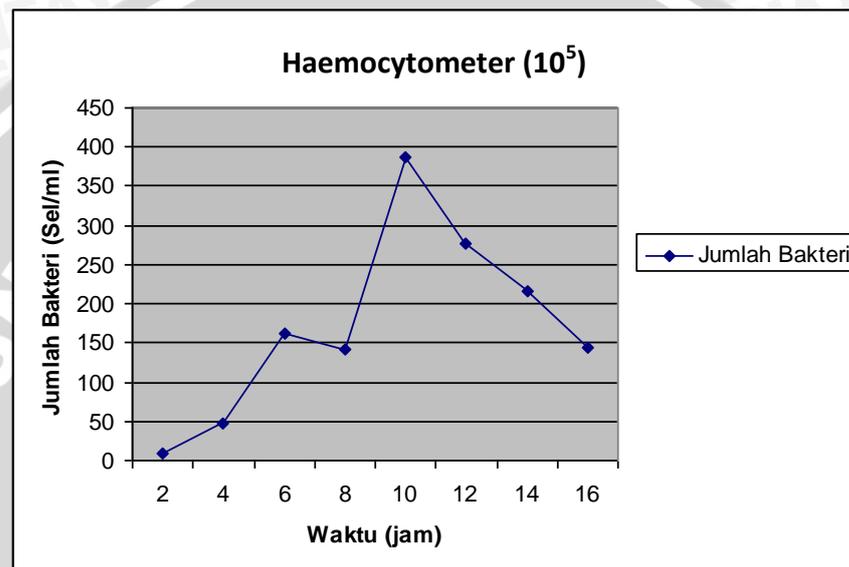
Dari kurva pertumbuhan *Bacillus firmus* pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa *Bacillus firmus* melakukan adaptasi pada fase lag ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan media starter untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan media produksi, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen.

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 bakteri terjadi pada jam ke-10 dengan nilai absorbansi 0,888. Oleh karena itu dilakukan isolasi protease pada jam ke-10 yang merupakan fase log bakteri, dimana pertumbuhan bakteri bersifat statis.

Setelah jam ke-10 pertumbuhan bakteri mengalami penurunan, yang disebut sebagai fase kematian. Hal ini disebabkan nutrisi-nutrisi yang terkandung dalam media pertumbuhan tersebut telah habis, sehingga bakteri tidak mampu untuk berkembang lagi sampai kemudian mengalami kematian.

Tabel 2. Data Hasil Analisa Haemocytometer

Jam	Jumlah Bakteri (Sel/mL)
2	$9,5 \times 10^5$
4	$48 \times 10^5$
6	$162,5 \times 10^5$
8	$142 \times 10^5$
10	$388 \times 10^5$
12	$276 \times 10^5$
14	$215 \times 10^5$
16	$143,5 \times 10^5$



Gambar 5. Hasil Analisa dengan Metode Haemocytometer

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus firmus* pada Gambar 5, dapat dilihat bahwa *Bacillus firmus* melakukan adaptasi pada fase lag, kemudian fase adaptasi. 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 bakteri terjadi pada jam ke-10 dengan jumlah bakteri  $388 \times 10^5$  sel/ml. Perhitungan menggunakan Haemocytometer dapat dilihat pada Lampiran 6.

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 (Putra dan Kosim,2009).

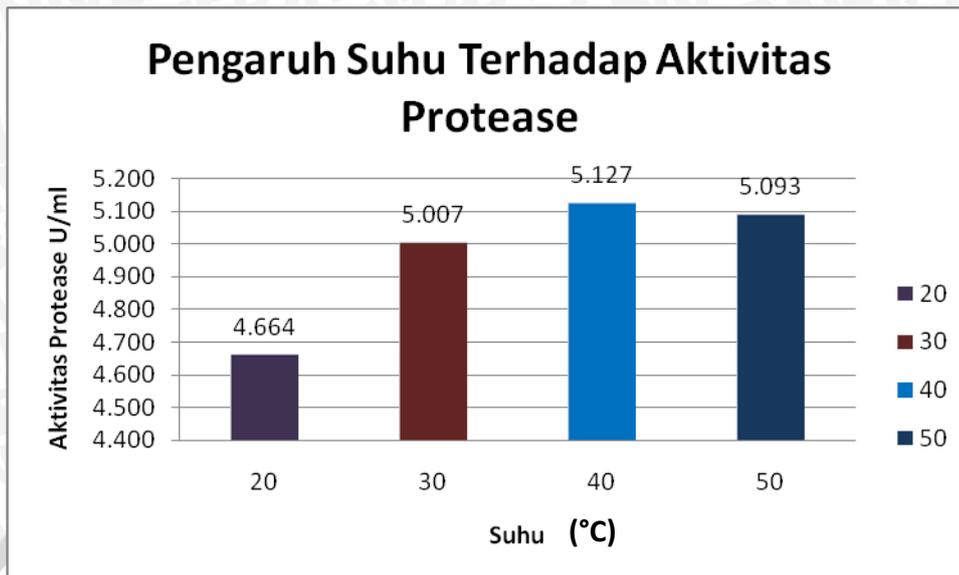
Dari kedua metode penentuan kurva pertumbuhan di atas didapatkan hasil terbaik dengan menggunakan metode Optical Densitas. Hal ini disebabkan pada metode ini menggunakan alat spektrofotometer sehingga dapat meminimalisir kesalahan. Kedua metode ini didapatkan fase log yang sama yaitu pada jam ke-10. Untuk mendapatkan aktivitas protease terbaik, bakteri *Bacillus firmus* ditumbuhkan sampai jam ke-10 pada saat pertumbuhan maksimal. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Nugroho (2006), fase log *Bacillus sp.* terjadi pada jam ke 48. Perbedaan hasil ini diduga disebabkan dari media pertumbuhan yang berbeda dimana pada penelitian yang dilakukan oleh Nugroho (2006) yang menggunakan media *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) yang ditambah ekstrak ragi 0,1% dan parafin cair 1%; dimana sumber karbon yang digunakan sebagai nutrisi penunjang adalah masing-masing heksadena, glukosa, parafin cair, dan minyak mentah, sedangkan sumber nitrogennya adalah ekstrak ragi.

#### 4.2. Hasil Analisa 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. Data hasil analisa perlakuan suhu dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 6.

**Tabel 3. Aktivitas Protease *Bacillus firmus* pada Perlakuan Suhu**

Suhu	Aktivitas Protease (U/mL) ± STD
20 °C	4,664 ± 0,184
30 °C	5,007 ± 0,063
40 °C	5,127 ± 0,089
50 °C	5,093 ± 0,073



**Gambar 6. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Protease**

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan didapatkan aktivitas enzim pada suhu 20°C cukup kecil karena suhu yang terlalu rendah. Aktivitas enzim optimum terdapat pada suhu 40°C yaitu sebesar 5,127 Unit/ml. Bakteri *Bacillus firmus* ini mampu menghasilkan enzim protease dengan maksimum pada suhu 40°C, sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri ini merupakan bakteri termofilik yang mampu hidup pada suhu 40°C. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Grata, *et al.*, (2010) yang melakukan pengamatan terhadap aktivitas protease dari *Bacillus mycoides* A 134 dengan menggunakan medium casein memiliki nilai aktivitas protease terbesar pada perlakuan suhu 60°C (11,44  $\mu$ mol). Hal berbeda juga didapatkan oleh Dewi (2006), yang menyebutkan bahwa aktivitas maksimal *Bacillus sp.* memproduksi enzim protease pada suhu 50°C. Perbedaan suhu optimum ini diduga karena perbedaan spesies dari *Bacillus* yang diuji. Selain itu pada penelitian yang dilakukan oleh Dewi (2006), enzim yang dihitung telah dilakukan pemurnian. Perhitungan aktivitas enzim pada perlakuan suhu dapat dilihat pada Lampiran 7.

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.

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 (Putra dan Kosim, 2009).

#### 4.3 Hasil Analisa Aktivitas Protease dengan Perlakuan pH dan Waktu Inkubasi

Analisa yang dilakukan pada perlakuan pH ini menggunakan lima pH yang berbeda yaitu 5, 6, 7, 8, 9. Data hasil analisa perlakuan suhu dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 7.

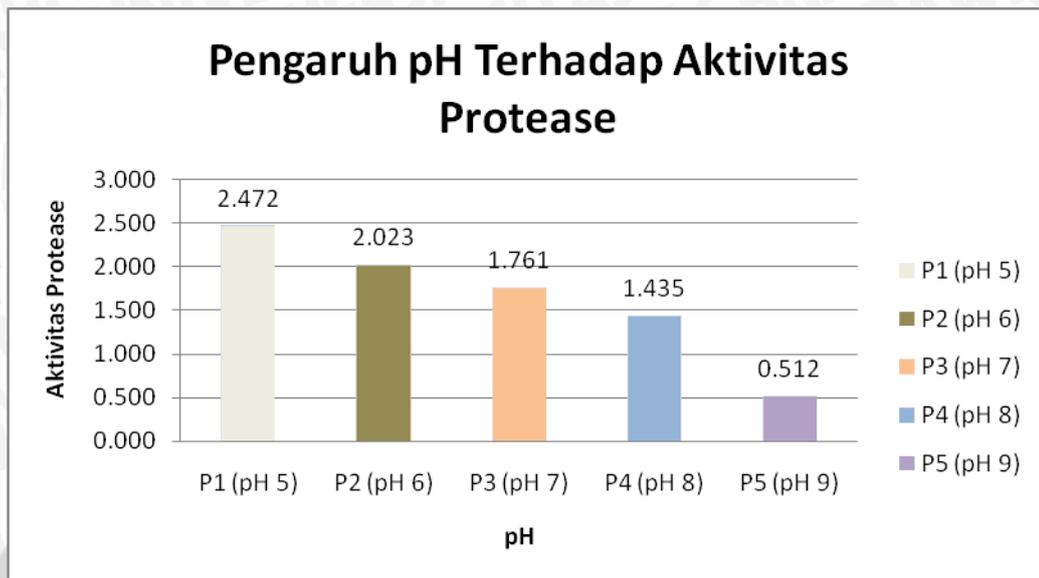
**Tabel 4. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Protease**

pH	Aktivitas Protease (U/m/mL) $\pm$ STD	Notasi
5	2,472 $\pm$ 0,353	e
6	2,023 $\pm$ 0,089	d
7	1,761 $\pm$ 0,155	c
8	1,435 $\pm$ 0,213	b
9	0,512 $\pm$ 0,142	a

Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata

Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata



**Gambar 7. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Protease**

Dari hasil pengamatan didapatkan aktivitas enzim terendah pada pH 9 (basa) yaitu sebesar 0,512 U/mL. Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada pH 5 (asam) yaitu sebesar 2,472 Unit/mL. Hal yang sama ditunjukkan oleh Mukherjee, *et al.*, (2010), dimana diperoleh aktivitas protease optimum dari *Bacillus firmus* KUCr1 terdapat pada pH 5. Kesamaan pH maksimum ini diduga spesies dari bakteri yang sama yaitu *Bacillus firmus* karena setiap spesies memiliki daya tahan terhadap pH yang berbeda. Berbeda dengan yang diutarakan oleh Sumarlin (2010), produksi protease pada media ARK optimum pada pH 9,28. Perbedaan pH optimum ini diduga dari penggunaan media yaitu menggunakan media yang mengandung Air Rendaman Kedelai (ARK) mempunyai kandungan protein yang cukup tinggi sebagai sumber nitrogen bagi mikroorganisme.

Bakteri *Bacillus firmus* mampu memproduksi enzim dengan maksimal pada pH 5 yang bersifat asam. pH mempengaruhi aktivitas enzim protease kasar yang dihasilkan oleh isolat. Enzim protease aktivitas optimumnya berada pada pH 6,0. Aktivitas protease isolat terlihat meningkat mulai dari pH 4,0 – pH 6,0 dan

mulai menurun pada pH 7,0 – pH 8,0. Perhitungan aktivitas enzim pada perlakuan suhu dapat dilihat pada Lampiran 8.

Data aktivitas protease *Bacillus firmus* disajikan dalam bentuk diagram pada Gambar 5. Untuk mengetahui apakah perlakuan pH yang berbeda benar-benar berpengaruh terhadap hasil penelitian, maka dilakukan analisis statistik. Hasil perhitungan sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas protease, yang berarti pemberian pH yang berbeda sangat berpengaruh terhadap bakteri untuk memproduksi enzim.

Dari hubungan pH dengan aktivitas protease pada Tabel 4, pemberian perlakuan pH yang berbeda memberikan pengaruh terhadap aktivitas protease. Penurunan aktivitas enzim protease terlihat pada pH 5 sampai dengan pH 9. Menurut Pelczar dan Chan (1986), terjadinya perubahan nilai pH selama proses inkubasi sangat mempengaruhi kerja enzim karena perubahan pH menyebabkan terjadinya perubahan pada daerah katalitik dan konformasi dari enzim, dimana sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim tersebut sangat mudah dipengaruhi oleh pH.

Selain itu, perubahan pH dapat menyebabkan denaturasi enzim sehingga dapat menimbulkan hilangnya fungsi katalitik enzim (Dick *et al.*, 2000). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pH merupakan salah satu faktor yang memiliki potensi untuk mempengaruhi aktivitas enzim, serta sangat erat kaitannya dengan fungsi aktif enzim, kelarutan substrat, dan ikatan enzim-substrat (Pelczar dan Chan, 1986, dalam Hidayat 2005).

Ketika aktivitas sebagian besar enzim diukur pada berbagai nilai pH, aktivitas optimum secara khas terlihat di antara nilai-nilai pH 5 dan pH 9 (Murray, 2003). Aktivitas katalitik enzim di dalam sel mungkin di atur oleh perubahan pada pH medium lingkungan (Lehninger, 2005 dalam Lengkana dan Sumardi, 2009).

Analisa yang dilakukan pada perlakuan waktu inkubasi ini menggunakan empat waktu yang berbeda yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam. Data hasil analisa perlakuan waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 8.

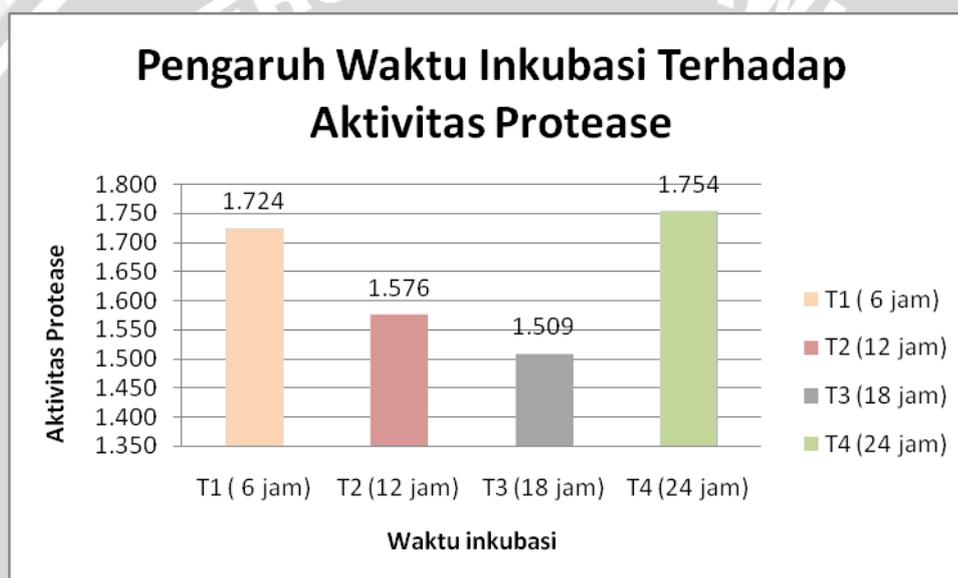
**Tabel 5. Waktu Inkubasi dengan Aktivitas Protease**

Waktu inkubasi	Aktivitas Protease (U/m/mL) $\pm$ STD	Notasi
6 jam	1,724 $\pm$ 0,746	a
12 jam	1,576 $\pm$ 0,706	a
18 jam	1,509 $\pm$ 0,692	a
24 jam	1,754 $\pm$ 0,866	a

Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata

Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata



**Gambar 8. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Protease**

Dari hasil pengamatan didapatkan aktivitas enzim protease pada perlakuan T4 (24 jam) memiliki nilai rata-rata aktivitas protease terbesar bila dibandingkan dengan perlakuan yang lain, yaitu sebesar 1,754 U/mL. Hal ini sesuai dengan pengamatan yang dilakukan Alves, *et al.*, (2005) dalam Choliq (2008), enzim mulai mensintesa protease pada jam 24 inkubasi tetapi tingginya aktivitas protease tidak selalu dipengaruhi oleh konsentrasi biomassa dan fase pertumbuhannya. Berbeda dengan yang diutarakan oleh Sumarlin (2010), produksi protease pada media ARK optimum pada jam ke-56. Perbedaan waktu

inkubasi optimum ini diduga dari penggunaan media yaitu menggunakan media yang mengandung Air Rendaman Kedelai (ARK) mempunyai kandungan protein yang cukup tinggi sebagai sumber nitrogen bagi mikroorganisme sehingga memperlama proses akhir fase logaritmik dari fase pertumbuhan.

Data aktivitas protease *Bacillus firmus* disajikan dalam bentuk diagram pada Gambar 7. Untuk mengetahui apakah perlakuan waktu inkubasi yang berbeda benar-benar berpengaruh terhadap hasil penelitian, maka dilakukan analisis statistik. Hasil perhitungan sidik ragam menunjukkan bahwa waktu inkubasi yang berbeda memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata terhadap aktivitas protease. Yang berarti waktu inkubasi tidak terlalu memberikan pengaruh terhadap bakteri untuk memproduksi enzim.

Menurut Ward (1983), dalam Sumarlin (2010), pembentukan enzim protease mulai meningkat selama memasuki fase eksponensial, kemudian meningkat selama dengan cepat memasuki stationer. Dalam keadaan normal sintesis enzim ekstraseluler maksimum terjadi sebelum fase stationer atau akhir fase eksponensial menjelang fase stationer (Scafer, 1969). Ditambahkan oleh Kumalaningsih (1989), dalam Sumarlin (2010), produksi enzim sejajar dengan kurva pertumbuhan dan mencapai optimal pada akhir fase eksponensial.

Dari hasil kedua analisa di atas menunjukkan bahwa pH memberikan pengaruh berbeda nyata yang berarti pH memberikan pengaruh yang lebih besar daripada perlakuan dengan waktu inkubasi yang tidak berbeda nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa pH sangat berpengaruh terhadap kemampuan *Bacillus firmus* untuk memproduksi enzim protease.