

**KARAKTERISTIK AKTIVITAS PROTEASE BAKTERI *Bacillus pumilus*
ISOLAT DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN**

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

Oleh:

GUNTUR RYAN YUDAIRAWAN

NIM. 0610830047

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2012

**KARAKTERISTIK AKTIVITAS PROTEASE BAKTERI *Bacillus pumilus*
ISOLAT DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN**

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

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

Oleh:

GUNTUR RYAN YUDAIRAWAN

NIM. 0610830047

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

**KARAKTERISTIK AKTIVITAS PROTEASE BAKTERI *Bacillus pumilus*
ISOLAT DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN**

**Penyusunan Laporan Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas
Brawijaya Malang**

Oleh:

GUNTUR RYAN YUDAIRAWAN

NIM. 0610830047

Dosen Penguji I

Ir. Yahya, M.P.

NIP : 19630706 199003 1 005

Tanggal :

Dosen Penguji II

Asep Awaludin Prihanto, S.Pi. M.P.

NIP : 19810602 200604 1 001

Tanggal:

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. PhD

NIP. 19640919 198903 1 002

Tanggal:

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih. M.S.

NIP : 19640604 199002 2 002

Tanggal:

Mengetahui,

Ketua Jurusan

Dr. Ir. Happy Nursyam. M.S.

NIP : 19600322 198601 1 001

Tanggal:

PERNYATAAN ORISINILITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam penelitian yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan penelitian ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 20 Juni 2012

Mahasiswa,

GUNTUR RYAN Y.

NIM:0610830047



RINGKASAN

GUNTUR RYAN YUDAIRAWAN. Skripsi Karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin (di bawah bimbingan Prof. Ir. SUKOSO, M.Sc. PhD dan Dr. Ir. HARTATI KARTIKANINGSIH, MS)

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2011 sampai Februari 2012. Tujuan penelitian yang dilakukan adalah Mengetahui karakteristik aktivitas enzim protease *Bacillus pumilus* yang dihasilkan oleh isolasi ikan teri asin meliputi suhu optimum, pH optimum, waktu inkubasi serta konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}).

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu Bakteri *Bacillus pumilus* yang didapatkan dari kultur stok dari penelitian sebelumnya, casein, NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*) yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Bahan kimia yang digunakan yaitu *casein Hammersten* (2% casein dalam 0,05M larutan buffer fosfat pH 7,0), *tyrosin standart*, larutan TCA 5% dan buffer phosphat 0,01M yang didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kertas saring Whatman no.42, pereaksi folin, Na_2CO_3 0,5M, HCl 0,05M, $CaCl_2$ 2mmol/L, aluminium foil, alkohol 70% dan aquadest didapatkan dari CV. Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha Blok I no. 238 Malang.

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksploratif untuk mencapai tujuan yang utama yaitu untuk mengetahui karakteristik aktivitas enzim proteolitik kasar *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri asin. Metode eksploratif yaitu penelitian dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus, yang masih kurang diketahui orang. Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah dicari fase log bakteri *Bacillus pumilus* kemudian diberi perlakuan suhu yang berbeda (20°C, 40°C, 60°C, 80°C), perlakuan pH yang berbeda (5, 6, 7, 8, 9) dan lama inkubasi yang berbeda (4, 8, 12, 16 jam) untuk mengetahui aktivitas optimum enzim protease serta dihitung V_{maks} dan K_m dari bakteri *Bacillus pumilus* tersebut.

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus pumilus* memiliki fase log pada jam ke-12 dengan nilai absorbansi sebesar 0,597, suhu optimum pada suhu 40°C dengan aktivitas protease sebesar 1,241 U/menit/mL, pH optimum pada pH 6 dengan aktivitas protease sebesar 3,546 U/menit/mL, waktu inkubasi pada jam ke-12 dengan aktivitas protease sebesar 6,222 U/menit/mL dan mempunyai nilai V_{maks} sebesar 0,0110918 mM L⁻¹ min⁻¹ dan K_m sebesar 889,3375 mM.

Dari hasil penelitian ini disarankan perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian enzim protease *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin, sehingga hasil aktivitas enzim protease yang didapatkan lebih murni.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberi rahmat sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih kami sampaikan kepada :

1. Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. PhD dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.S selaku Dosen Pembimbing, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Ir. Yahya, M.P. dan Asep Awaludin Prihanto, S.Pi. M.P. selaku dosen penguji atas segala petunjuk dan masukan-masukan yang telah diberikan demi menyempurnakan laporan ini
3. Laboratorium Sentral Ilmu hayati Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
4. Semua pihak yang telah memberi bantuan dan dorongan sehingga laporan ini dapat terselesaikan dengan baik.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang lebih atas jasa dan kebaikan mereka. Penulis menyadari bahwa dalam laporan ini masih terdapat banyak kekurangan, sehingga adanya kritik dan saran dari pembaca nantinya kami harapkan dapat menambah kesempurnaan laporan ini. Akhirnya, semoga dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan perikanan khususnya bagi kami pribadi dan pembaca

Malang, 8 Juli 2012

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Selama melaksanakan penelitian hingga penyusunan laporan akhir, penulis banyak memperoleh bantuan dan dukungan dari berbagai pihak yang tak terhitung nilainya. Untuk itulah dalam kesempatan ini, penulis ingin memberikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ayah dan ibu tercinta atas limpahan kasih sayang, do'a, dukungan serta materi yang telah diberikan.
2. Teman satu tim : saudara Bagus Indria, Mahbub Zunaidi dan saudari Arizka Hikmatul Jihad yang telah berjuang bersama selama berbulan-bulan, memberikan semangat, dan menjadikan sebuah keluarga baru yang tertulis di sanubari panulis.
3. Ibu Iwin Zunairoh dan kakak Titik yang telah memberikan tempat untuk melaksanakan penelitian ini sehingga dapat terlaksana dengan baik.
4. Kakek dan nenek serta Saudara-saudara dari penulis atas segala bantuan material dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
5. Ibu Kost dan temen-temen satu kost atas dorongan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.
6. Saudara Aunus Zhabur, Berlian Cahya P., Bayu Dwi C., Budi Widya P., Nugroho Maulia atas seluruh masukan, dorongan, semangat, dan dukungan selama penulis melakukan penelitian.
7. Temen-temen Teknoogi Hasil Perikanan 2006 atas perjuangan dan petualangan selama menjadi mahasiswa, semoga ikatan kekeluargaan dan kebersamaan THP 2006 tidak pernah hilang sepanjang massa.
8. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Atas semua bantuan yang diberikikan oleh semua pihak tersebut, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya. Jika kemampuan membalas

budi baik tidak terdapat pada diri penulis, semoga Allah berkenan melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada mereka.

Malang, 8 Julii 2012

GUNTUR RYAN Y.

NIM:0610830047



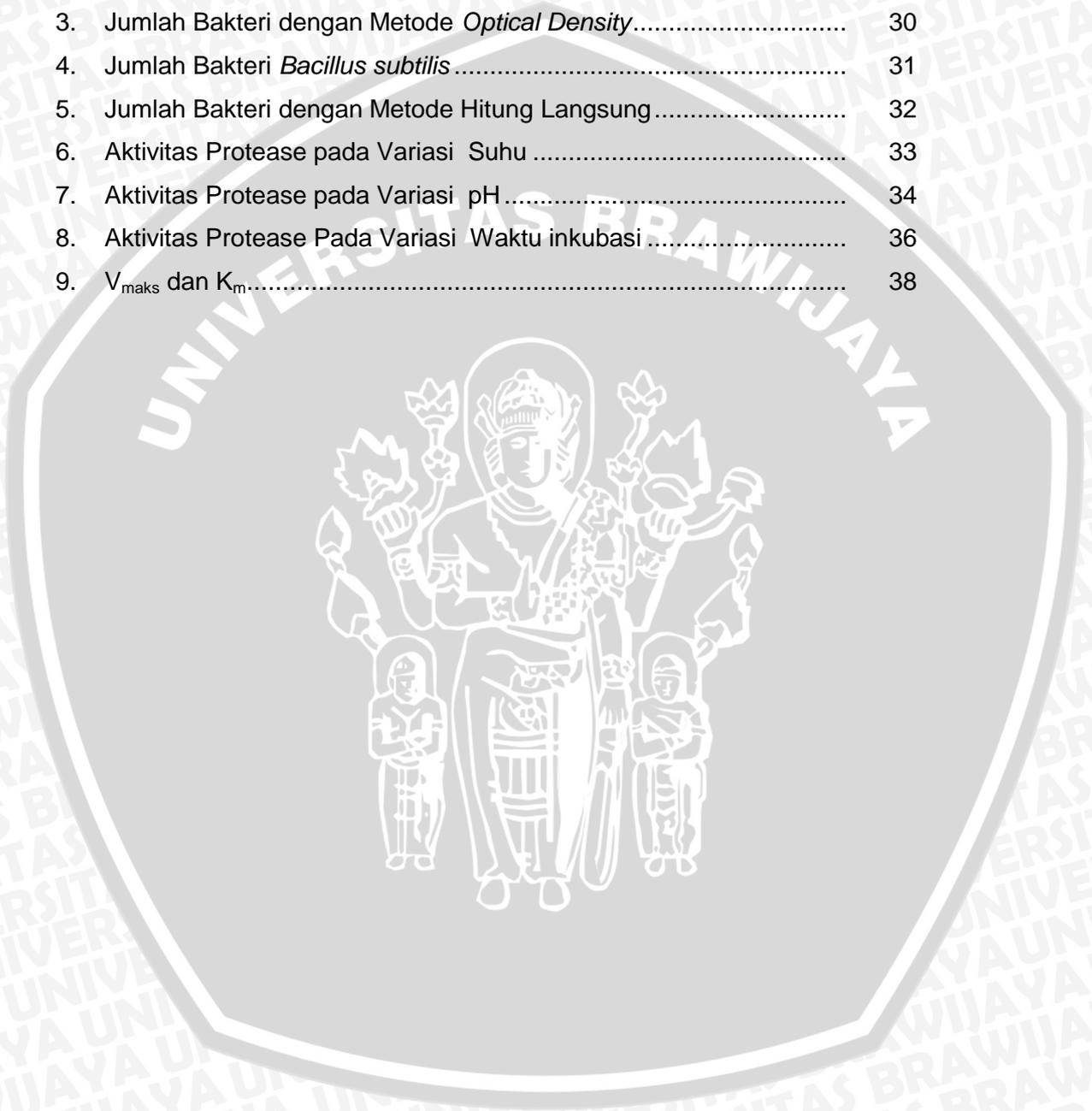
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINILITAS	iii
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Bacillus pumilus</i>	5
2.2 Bakteri Proteolitik	6
2.3 Enzim Protease	7
2.4 Isolasi Bakteri Proteolitik	10
2.5 Karakteristik Bakteri Proteolitik.....	11
2.6 Kurva Pertumbuhan	12
2.6.1 Analisa Gravimetri	14
2.6.2 Analisa <i>Optical Density</i>	15
2.7 Pengujian Aktivitas Protease.....	17
2.8 Penentuan K_m Dan V_{maks}	19
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitan	20
3.1.1 Bahan penelitian.....	20

3.1.2 Alat penelitian.....	20
3.2 Metode Penelitian	21
3.3 Prosedur Penelitian	21
3.3.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat	21
3.3.2 Kurva Pertumbuhan.....	22
3.3.3 Produksi Enzim.....	23
3.3.4 Pengujian Aktivitas Protease	24
3.3.4.1 Penentuan pH Optimum Enzim Protease	25
3.3.4.2 Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease.....	25
3.3.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Enzim Protease	26
3.3.4.4 Penentuan K_m Dan V_{maks}	26
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik	28
4.1.1 Kurva Pertumbuhan (Metode Gravimetri)	28
4.1.2 Kurva Pertumbuhan (Metode <i>Optical Density</i>).....	29
4.1.3 Kurva Pertumbuhan (Metode Hitung Langsung).....	31
4.2 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan Suhu.....	33
4.3 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan pH.....	34
4.4 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan Waktu Inkubasi	35
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	43

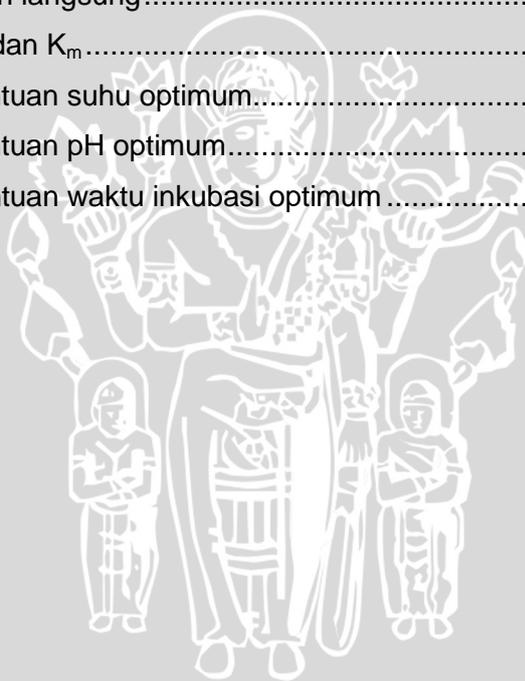
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Bakteri <i>Bacillus pumilus</i>	6
2. Jumlah Bakteri dengan Metode Gravitimetri.....	28
3. Jumlah Bakteri dengan Metode <i>Optical Density</i>	30
4. Jumlah Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	31
5. Jumlah Bakteri dengan Metode Hitung Langsung.....	32
6. Aktivitas Protease pada Variasi Suhu.....	33
7. Aktivitas Protease pada Variasi pH.....	34
8. Aktivitas Protease Pada Variasi Waktu inkubasi.....	36
9. V_{maks} dan K_m	38



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Pembuatan kultur stok isolat	43
2. Kurva pertumbuhan bakteri proteolitik.....	45
3. Penentuan produksi enzim (<i>crude enzim</i>)	47
4. Penentuan pH optimum.....	48
5. Penentuan suhu optimum	50
6. Penentuan waktu inkubasi optimum.....	52
7. Penentuan V_{maks} dan K_m	54
8. Langkah-langkah analisa gravimetri.....	58
9. Analisa <i>optical density</i> (OD).....	60
10. Analisa perhitungan langsung.....	62
11. Perhitungan V_{maks} dan K_m	63
12. Perhitungan penentuan suhu optimum.....	66
13. Perhitungan penentuan pH optimum.....	68
14. Perhitungan penentuan waktu inkubasi optimum	70



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri merupakan organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini termasuk ke dalam domain prokariota dan berukuran sangat kecil (mikroskopik), serta memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai agen penyebab infeksi dan penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat dibidang pangan, pengobatan, dan industri (Wikipedia, 2012). Bakteri berdasarkan bentuknya dapat dibagi menjadi tiga golongan yaitu kokus (*Coccus*), spiral (*Spirillum*) dan basil (*Bacillus*), salah satu contoh dari *Bacillus* yaitu *Bacillus pumilus*.

Bacillus pumilus mampu hidup di lingkungan berkadar garam tinggi sehingga termasuk bakteri halofilik. Bakteri halofilik merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang dapat hidup di lingkungan berkadar garam tinggi hingga 30%. Bakteri tersebut dapat ditemukan pada makanan yang diawetkan dengan penggaraman antara lain ikan asin (Andriyani, 2009). Ikan asin merupakan salah satu jenis makanan yang diolah dan diawetkan dengan menggunakan konsentrasi garam yang relatif tinggi sehingga optimal untuk pertumbuhan bakteri halofilik (Buckle *et. al.*, 1987).

Eksplorasi tentang bakteri halofilik dari berbagai sumber telah banyak dilakukan dan akan terus dilakukan. Berbagai penelitian tentang bakteri halofilik telah dilakukan diantaranya seleksi dan identifikasi isolat bakteri halofilik penghasil enzim amilase dan protease dari asinan sawi (Hanum, 2009), isolasi dan identifikasi bakteri halofilik dari ikan asin (Andriyani, 2009). Bakteri halofilik memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam industri karena hampir semua anggota kelompok bakteri halofilik mampu tumbuh di kadar garam yang tinggi dan mudah ditumbuhkan karena kebutuhan nutrisinya yang sederhana. Bakteri

halofilik ini mampu memproduksi senyawa-senyawa yang berguna seperti enzim, salah satunya adalah enzim protease.

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Karena itu enzim ini termasuk dalam kelas utama enzim golongan hidrolase. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisikokimia dan sifat-sifat katalitik yang sangat bervariasi. Enzim ini dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme, serta mempunyai peranan yang penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward, 1983).

Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Oleh karena itu sekarang ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya tekanan dari para ahli dan pecinta lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri (Falch 1991). Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan limbah (Moon dan Parulekar 1993). Namun penelitian tentang karakterisasi aktivitas enzim protease dari bakteri *Bacillus pumilus* yang diisolasi dari ikan teri asin masih belum banyak dilakukan di Indonesia. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian tentang karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

1.2 Rumusan Masalah

Bacillus pumilus merupakan mikroba yang dapat menghasilkan enzim, mikroba yang tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstrasel membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri. (Susanti, 2003). Industri pengguna enzim protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan limbah (Moon dan Parulekar 1993). Tetapi masih belum banyak penelitian tentang karakterisasi enzim protease *Bacillus pumilus* terutama yang berasal dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

Dari uraian tersebut maka didapatkan permasalahan:

Bagaimanakah karakteristik aktivitas enzim protease *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk:

Mengetahui karakteristik aktivitas enzim protease *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri asin meliputi suhu optimum, pH optimum, waktu inkubasi serta konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimal (V_{maks}).

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai informasi kepada penelitian selanjutnya atau peneliti lain tentang karakteristik aktivitas enzim protease meliputi penentuan nilai suhu optimum, pH optimum, waktu inkubasi

serta konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimum (V_{maks}) yang diisolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

1.5 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati dan Laboratorium mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2011 sampai Februari 2012.



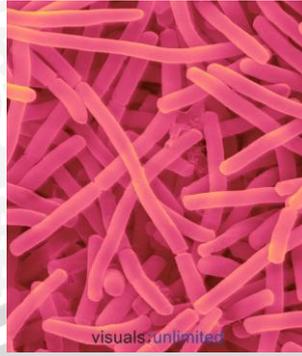
2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus pumilus*

Spesies *Bacillus pumilus* termasuk bakteri gram positif, katalase positif yang umum ditemukan di tanah. *Bacillus pumilus* mempunyai kemampuan untuk membentuk endospora yang protektif yang memberi kemampuan bakteri tersebut mentolerir keadaan yang ekstrim. Tidak seperti species lain seperti sejarah, *Bacillus pumilus* tidak dianggap sebagai patogen walaupun kontaminasi makanan tetapi jarang menyebabkan keracunan makanan. Sporangya dapat tahan terhadap panas tinggi yang sering digunakan pada makanan dan bertanggung jawab terhadap kerusakan pada roti.

Bacillus pumilus selnya berbentuk basil, ada yang tebal dan yang tipis. Biasanya bentuk rantai atau terpisah. Sebagian motil dan adapula yang non motil. Semua membentuk endospora yang berbentuk bulat dan oval. *Bacillus pumilus* merupakan jenis kelompok bakteri termofilik yang dapat tumbuh pada kisaran suhu 45 °C – 55 °C (Yongki, 2008).

Aplikasi bakteri ini dalam industri cukup banyak. *Bacillus subtilis* merupakan salah satu yang paling banyak digunakan untuk produksi enzymes dan bahan kimia khusus. Aplikasi industri termasuk produksi amylase, protease, inosine, ribosides, dan asam amino. Selain itu, aplikasinya banyak sekali. Enzymes diproduksi oleh *B. subtilis* dan *B. licheniformis* secara luas digunakan sebagai tambahan dalam laundry deterjen (Kamelia, *et al.*, 2005). Gambar *Bacillus pumilus* dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Bakteri *Bacillus pumilus* (Wikipedia, 2011)

2.2 Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler (Wikipedia, 2011).

Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim proteinase di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim proteinase ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat dibedakan atas beberapa kelompok yaitu: bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang tidak membentuk spora misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*, bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang membentuk spora misalnya *Bacillus*, dan bakteri anaerobik pembentuk spora misalnya sebagian *Clostridium* (Fardiaz, 1992). Genus-genus mikroba penghasil proteolitik meliputi *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, berbagai jamur dan khamir (Hidayat, *et. al.*, 2006).

Hidrolisis protein oleh mikroorganisme pada makanan mungkin menghasilkan berbagai macam kerusakan bau dan rasa. Selama proses

hidrolisis, protein didegradasi melalui proteosa, pepton, polipeptida dan dipeptida menjadi asam amino. Selanjutnya penipuan oleh asam amino berperan penting untuk karakteristik bau busuk pada beberapa makanan yang telah rusak. Jenis bakteri proteolitik umumnya diantara genus *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* dan *Proteus*, termasuk proteolitik ragi dan jamur. Mikroorganisme yang membawa hidrolisis protein dan fermentasi asam disebut sebagai proteolitik asam, contohnya *Enterococcus faecalis* dan *Micrococcus caseolyticus* (Downes dan Ito, 2001).

2.3 Enzim Protease

Protease merupakan enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme (Rao *et al.*, 1998). Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease dibatasi oleh tersedianya tanah untuk penanaman dan kondisi yang cocok untuk pertumbuhan. Disamping itu proses produksi protease dari tumbuhan sangat memakan waktu. Protease tumbuhan yang dikenal antara lain papain, bromelain, dan keratinase. Protease hewan yang paling dikenal adalah tripsin, kimotripsin, pepsin dan rennin. Enzim-enzim ini dapat diperoleh dalam keadaan murni dengan jumlah besar (Kosim dan Putra, 2010).

Enzim ini dapat dihasilkan secara intraseluler dan ekstraseluler oleh tanaman, hewan, dan mikrob, serta mempunyai peranan penting dalam metabolisme dan regulasi dalam sel. Enzim ekstraseluler disekresikan ke luar sel dan mendegradasi senyawa polimer menjadi senyawa yang lebih sederhana yang mudah larut dan diserap melalui dinding sel. Enzim ekstraseluler banyak

digunakan dalam industri, karena dihasilkan dalam jumlah besar dan metode ekstraksi cukup mudah (Fatimah, 2005).

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino (Kamelia, *et. al.*, 2005). Menurut Roosdiana, *et. al.*, (2003), enzim protease merupakan enzim ekstraseluler yang dikeluarkan oleh mikroba, berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein yang menghasilkan peptida lebih sederhana atau juga menghasilkan asam amino. Enzim protease dalam hasil pengolahan perikanan dapat dipakai untuk melarutkan protein yang tidak diinginkan. Ditambahkan pula oleh Maharanie (2005), bahwa protein diuraikan menjadi asam amino dengan adanya enzim protease kemudian asam amino dapat diserap ke dalam sel yang dipakai untuk sintesa protein atau dipecah lebih lanjut untuk menghasilkan energi atau bahan bangunan untuk reaksi anabolisme. Protease terdiri atas empat subkelompok berdasarkan mekanisme katalitik enzim, yaitu: protease serin, protease sistein, protease asam, dan protease logam atau metaloprotease (Fatimah, 2005).

Enzim proteolitik atau protease mempunyai 2 (dua) pengertian, yaitu: proteinase yang mengkatalis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar, dan peptidase yang menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Enzim proteolitik yang berasal dari mikroorganisme adalah protease yang mengandung proteinase dan peptidase. Proteinase biasanya akan dikeluarkan oleh mikroorganisme pada media fermentasi selama pertumbuhannya sedangkan peptidase didapat hanya bila sel mengalami autolisis (Muchtadi, *et. al.*, 1992). Enzim protease berperan besar dalam proses-proses seluler akibat kemampuan proteolitiknya yang esensial. Proses-proses tersebut meliputi digesti, translokasi, tukar ganti protein, sekresi

protein, aktivitas enzim dan hormon. Protease juga terlibat dalam aktivitas beberapa toksin yang penting dalam makanan. Oleh karena itu, aktivitas protease perlu dimanipulasi sehingga dapat dimanfaatkan secara luas (Sperber dan Torrie, 1982).

Penggunaan mikroorganisme sebagai sumber enzim protease dan kemungkinannya untuk melakukan manipulasi genetik, menjadikan protease mikroba lebih banyak dikembangkan. Banyak protease komersial, baik itu netral maupun alkalin, dihasilkan oleh *Bacillus*. Protease netral dari bakteri mampu aktif pada pH 5-8 dan memiliki toleransi suhu yang relative rendah. Neutrased, suatu protease netral banyak digunakan pada proses hidrolisis protein makanan dalam industri makanan dengan derajat hidrolisis yang rendah. Beberapa protease netral termasuk jenis protease logam dan membutuhkan ion logam divalen untuk aktivitasnya. Sebagian lagi termasuk protease serin, tidak membutuhkan ion logam dalam aktivitasnya. Protease alkalin dari bakteri memiliki aktivitas tertinggi pada pH 10 dan temperatur optimal pada suhu 60°C. Sifat-sifat yang dimiliki protease ini membuatnya cocok untuk digunakan dalam industri detergen (Susanti, 2003).

Enzim protease merupakan salah satu enzim industri yang telah sukses secara komersial dan digunakan baik untuk industri pangan maupun non-pangan. Protease, yaitu enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan-ikatan peptide pada protein, merupakan enzim yang penting dan memiliki nilai ekonomi paling tinggi karena aplikasinya yang luas. Beberapa industri pengguna protease antara lain adalah industri deterjen (Banarjee, *et. al.*, 1999), kulit, hidrolisat protein, pengolahan susu (Green, 1984), farmasi, makanan, bir, film, dan limbah (Fujiwara, *et. al.*, 1991). Oleh karena itu tidak mengherankan bila pasaran protease mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan dalam bidang industri, sehingga kebutuhan akan enzim ini sangat besar. Enzim protease

terdapat pada semua makhluk hidup dan berperan dalam berbagai fungsi fisiologis serta proses pengaturan metabolisme. Saat ini, mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling banyak digunakan karena berbagai kelebihan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Mikroorganisme mampu menghasilkan enzim protease secara intraseluler maupun ekstraseluler. Dalam industri enzim intraseluler karena dihasilkan dalam jumlah lebih besar dan lebih mudah diperoleh melalui suatu rangkaian pemisahan dan pemurnian sederhana (Fuad, *et. al.*, 2001).

2. 4 Isolasi Bakteri Proteolitik

Isolasi bakteri proteolitik dapat dilakukan menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). Kasein terhidrolisa dalam *Skim Milk Agar* yang keruh digunakan untuk menentukan proteolisis oleh mikroorganisme pada atau dalam cawan agar. Koloni bakteri proteolitik akan mengelilingi areal bening sebagai hasil dari konversi kasein menjadi komponen larutan nitrogen. Bagaimanapun juga, areal bening pada *milk agar* dapat dilakukan oleh bakteri yang menghasilkan asam dari karbohidrat terfermentasi. Areal bening pada *milk agar* biasanya hanya mencerminkan pemecahan kasein yang lebih lengkap, karena tahapan awal proteolisis tidak dapat diketahui pada latar belakang yang keruh. Penegasan proteolisis, pengendap kimiawi protein (larutan asam cair) ditambahkan pada permukaan agar untuk mempercepat beberapa protein yang tidak tercerna. Peningkatan skim milk agar dikembangkan dengan penambahan sodium kasein, trisodium citrate, dan kalsium klorida untuk standar metode agar. Sensitivitasnya yang bertambah berhubungan dengan deteksi pada langkah awal pemecahan kasein, pembentukan areal endapan (para kasein tak terlarut) dalam media transparan (Downes and Ito, 2001).

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

2.5 Karakterisasi Bakteri Proteolitik

Menurut Fatimah (2005), karakterisasi bertujuan untuk menentukan suhu dan pH optimum, ketahanan terhadap panas dan pH, serta pengaruh penambahan senyawa kation dan penghambat bakteri proteolitik. Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara penumbuhan bakteri pada berbagai pH. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara penumbuhan bakteri pada berbagai suhu inkubasi. Pengaruh penambahan senyawa penghambat dan kation, ekstrak kasar enzim direaksikan dengan etilena diamina tetra asetat (EDTA) dan berbagai kation monovalen (Na^+ dan K^+) dan kation bivalen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+}) yang masing-masing berasal dari garam NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , CuCl_2 , dan ZnCl_2 serta dilakukan pengujian ketahanan terhadap panas dan pH.

Bakteri dengan tipe berbeda memiliki kebutuhan yang jelas berbeda seperti pada suhu berapa mereka akan tumbuh. Bakteri akan dapat tumbuh dengan baik di antara suhu maksimum dan suhu minimum dari bakteri tersebut. Pertumbuhan terbaik suatu bakteri berada dalam jarak terbatas yang disebut suhu optimum.

Suhu optimum bagi pertumbuhan spesies mikroba adalah hubungan terbaik dengan suhu habitat asli organism tersebut (Seeley dan Vandemark, 1976).

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

2.6 Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan adalah penambahan secara teratur semua komponen sel suatu jasad. Pembelahan sel adalah hasil dari pembelahan sel. Pada jasad bersel tunggal (uniseluler), pembelahan atau perbanyakan sel merupakan penambahan jumlah individu. Misalnya pembelahan sel pada bakteri akan menghasilkan penambahan jumlah sel bakteri itu sendiri. Pada jasad bersel banyak (multiseluler), pembelahan sel tidak menghasilkan penambahan jumlah individunya, tetapi hanya merupakan pembentukan jaringan atau bertambah besar jasadnya. Dalam membahas pertumbuhan mikroba harus dibedakan antara pertumbuhan masing-masing individu sel dan pertumbuhan kelompok sel atau pertumbuhan populasi.

Pertumbuhan dapat diamati dari meningkatnya jumlah sel atau massa sel (berat kering sel). Pada umumnya bakteri dapat memperbanyak diri dengan

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

Di dalam populasi bakteri tidak semua sel mampu terus bertahan hidup. Yang dianggap sebagai sel hidup adalah sel yang mampu membentuk koloni di dalam agar biak atau membentuk suspensi di dalam larutan biak. Sel-sel yang mampu hidup terus inilah yang dihitung dengan berbagai metode untuk menetapkan jumlah sel hidup. Kultur mikroorganisme pada lingkungan yang baru melakukan pengenalan terhadap komponen makromolekul dan mikromolekul termasuk kegiatan untuk mendapatkan pengetahuan akan sintesis atau repressi enzim-enzim tertentu (Said, 1987). Pada jumlah total sel ikut dihitung semua sel yang nampak atau yang dapat dihitung dengan cara lain, sehingga dengan demikian sel-sel mati dan cacat ikut dihitung (Volk dan Wheeler, 1993).

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

mengestimasi massa sel atau banyaknya sel tidak dapat digunakan dan cara yang diperlukan adalah cara yang tidak langsung (Judoamidjojo, *et. al.*, 1990).

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

Selanjutnya setelah substrat atau persenyawaan tertentu yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri dalam media biakan mendekati habis dan terjadi penumpukan produk-produk penghambat, maka terjadi penurunan laju pertumbuhan bakteri tersebut. Fase penurunan ditandai oleh berkurangnya jumlah sel hidup (*viabile*) dalam media akibat terjadinya kematian (*mortalitas*) (Mangunwidjaja. *et al.*,1994).

2.6.1 Analisa Gravimetri

Analisa gravimetri adalah proses isolasi dan pengukuran berat suatu unsur atau senyawa tertentu. Bagian terbesar dari penentuan secara analisis gravimetri meliputi transformasi unsur atau radikal senyawa murni stabil yang dapat segera diubah menjadi bentuk yang dapat ditimbang dengan teliti. Sehingga dapat diketahui massa tetapnya (Khopkar, 2003).

Prinsip dasar metode gravimetri yaitu untuk analisa kuantitatif didasarkan pada stokiometri reaksi pengendapan, gravimetri metode pengendapan ini menggunakan pereaksi yang akan menghasilkan endapan dengan zat yang dianalisa sehingga mudah dipisahkan dengan cara panyaringan (Fatimah, 2005).

Pada gravimetri agar hasil analisa dianggap baik dan benar maka ada beberapa faktor yang harus diperhatikan, antara lain : kesempurnaan pengendapan, kemurnian endapan dan susunan endapan. Yang dimaksud endapan murni adalah yang bersih yang artinya tidak mengandung molekul-molekul lain yang biasanya disebut sebagai pengotor. Dan yang dimaksud dari kesempurnaan pengendapan adalah pengendapan diusahakan sesempurna mungkin, oleh karena itu kelarutan endapan harus dibuat sekecil mungkin (Basset, 1994).

2.6.2 Analisa Optical Dencity

Analisa optical dencity ini menggunakan metode spektrofotometer. Salah satu contoh instrumentasi analisis yang lebih kompleks adalah spektrofotometer UV-Vis. Alat ini banyak bermanfaat untuk penentuan konsentrasi senyawa-senyawa yang dapat menyerap radiasi pada daerah ultraviolet (200 – 400 nm) atau daerah sinar tampak (400 – 800 nm) (Sastrohamidjojo, 1991). Analisis ini dapat digunakan yakni dengan penentuan absorbansi dari larutan sampel yang diukur. Prinsip penentuan spektrofotometer UV-Vis adalah aplikasi dari Hukum Lambert-Beer, yaitu:

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

Dimana :

- A = Absorbansi dari sampel yang akan diukur
- T = Transmittansi
- I₀ = Intensitas sinar masuk
- I_t = Intensitas sinar yang diteruskan
- ε = Koefisien ekstingsi
- b = Tebal kuvet yang digunakan
- C = Konsentrasi dari sampel

2.6.3 Analisa Perhitungan Langsung

Analisa perhitungan langsung ini menggunakan metode haemocytometer. Jumlah bakteri dapat dihitung secara langsung maupun tak langsung. Disini akan diterangkan penghitungan bakteri secara langsung. Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah *Petroff-Hauser Chamber* atau *Haemocytometer*. Jumlah cairan yang terdapat antara *coverglass* dan alat ini mempunyai volume tertentu sehingga satuan isi yang terdapat dalam satu bujur sangkar juga tertentu. Ruang hitung terdiri dari 9 kotak besar dengan luas tiap kotak 1 mm². Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,2 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel bakteri yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui (Anonymous, 2010).

Metode pengukuran pertumbuhan yang sering digunakan adalah dengan menentukan jumlah sel yang hidup dengan jalan menghitung koloni pada pelat agar dan menentukan jumlah total sel/jumlah massa sel. Selain itu dapat dilakukan dengan cara metode langsung dan metode tidak langsung. Dalam menentukan jumlah sel yang hidup dapat dilakukan penghitungan langsung sel secara mikroskopik, melalui 3 jenis metode yaitu metode: pelat sebar, pelat tuang dan most-probable number (MPN). Sedang untuk menentukan jumlah total sel dapat menggunakan alat yang khusus yaitu bejana Petrof-Hausser atau hemositometer. Penentuan jumlah total sel juga dapat dilakukan dengan metode turbidimetri yang menentukan: Volume sel mampat, berat sel, besarnya sel atau

koloni, dan satu atau lebih produk metabolit. Penentuan kuantitatif metabolit ini dapat dilakukan dengan metode Kjeldahl (Iqbalali, 2008).

2.7 Pengujian Aktivitas Protease

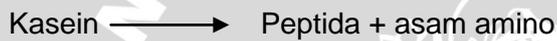
Menurut Sumardi dan Lengkana (2009), Untuk menentukan pH optimum enzim protease digunakan *buffer sitrat* untuk pH 4, pH 5 dan pH 6 serta *buffer Tris HCL* untuk pH 7, pH 8 dan pH 9. Terjadinya perubahan nilai pH selama proses inkubasi sangat mempengaruhi kerja enzim karena perubahan pH menyebabkan terjadinya perubahan pada daerah katalitik dan konformasi dari enzim, dimana sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim tersebut sangat mudah dipengaruhi oleh pH (Pelczar dan chan, 1986).

Semua reaksi enzimatik dipengaruhi pH, sehingga diperlukan bufer untuk mengontrol pH reaksi. Pada umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Diperkirakan perubahan keaktifan enzim adalah sebagai akibat perubahan ionisasi pada gugus ionik enzim, baik pada sisi aktifnya atau sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan dalam mengubah substrat menjadi produk. Perubahan ionisasi juga dapat dialami oleh substrat atau kompleks enzim-substrat, yang juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Muchtadi *et. al.* 1996). Pada skala deviasi pH yang besar, perubahan pH akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi sehubungan dengan adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3D enzim (Baehaki,*et. al.*, 2005).

Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Hal ini disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik,

sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim dan substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat (Kosim dan Putra, 2010).

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



Laju pembentukan peptide dan asam amino tersebut dapat dijadikan tolak ukur aktivitas katalis protease. Asam-asam amino yang terbentuk harus dipisahkan ini dilakukan dengan penambahan TCA. Penambahan TCA ini sekaligus menginaktifkan enzim protease. Asam-asam amino tirosin dan triptophan yang larut dalam TCA akan bereaksi dengan reagen folin menghasilkan warna biru. Warna yang terbentuk diukur absorbansinya pada daerah sinar tampak 578 nm dengan alat spektrofotometer Uv-vis. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis (Sumarlin, 2010). Untuk menentukan unit aktivitas per menit per ml enzim, digunakan rumus perhitungan aktifitas protease sebagai berikut:

$$U = \frac{\text{Asp-Abl} \times 1 \times 5 \mu\text{mol/ml}}{\text{Ast-Abl} \times T}$$

Keterangan = U : Unit aktifitas per menit per ml enzim
Asp : Nilai absorbansi sample
Ast : Nilai absorbansi standar
Abl : Nilai absorbansi Blanko
T : Waktu Inkubasi (menit)

2.8 Penentuan K_m dan V_{maks}

Dalam reaksi enzim dikenal kecepatan reaksi hidrolisis, penguraian atau reaksi katalisasi lain yang disebut velocity (V). Harga V dari suatu reaksi enzimatis akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat (S), akan tetapi setelah (S) meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap (tertentu) harga V hampir linier dengan (S). Pada kondisi dimana V tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya (S) disebut kecepatan maksimum (V_{maks}). V_{maks} merupakan salah satu parameter kinetika enzim (Kosim dan Putra, 2009).

Menurut Fox (1991), nilai K_m dapat digunakan dalam menentukan ukuran afinitas enzim-substrat (E-S), yang merupakan suatu indikator kekuatan ikatan kompleks E-S atau suatu tetapan keseimbangan untuk disosiasi kompleks E-S menjadi E dan S. Nilai K_m kecil berarti kompleks E-S mantap, afinitas enzim tinggi terhadap substrat, sedangkan bila K_m besar berlaku kebalikannya.

Penentuan nilai K_m dan V_m dapat dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim dengan menggunakan substrat dengan konsentrasi bervariasi. Nilai V_{maks} dan K_m dari xilanase diperoleh dari uji hidrolisis dengan substrat xilan pada interval konsentrasi 0,2% (b/v). Xilosa yang terbentuk diukur dengan metode pengukuran aktivitas standar. Enzim kasar berdasarkan grafik Lineweaver-Burk (Richana, *et al.*, 2008).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri *Bacillus pumilus* ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu Bakteri *Bacillus pumilus* yang didapatkan dari kultur stok dari penelitian sebelumnya, casein, NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*) yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan,

Universitas Brawijaya Malang. Bahan kimia yang digunakan yaitu *casein Hammersten* (2% kasein dalam 0,05M larutan buffer fosfat pH 7,0), *tyrosin standart*, larutan TCA (Tri Cloro Acid) 5% dan buffer phosphat 0,01M yang didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kertas saring Whatman no.42, pereaksi folin, Na_2CO_3 0,5M, HCl 0,05M, CaCl_2 2mmol/L, aluminium foil, alkohol 70% dan aquadest didapatkan dari CV. Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha Blok I no. 238 Malang.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari, tabung reaksi merk *Pyrex*, rak tabung reaksi, pipet serologis merk *Pyrex*, pipet volume 10 ml merk *Pyrex*, mikropipet merk *Avi-Teck*, bola hisap, gelas ukur 25 ml, 50 dan 100 ml merk *Pyrex*, erlenmeyer 50 ml merk *Duran*, beaker glass 50, 100, 200 dan 500 ml merk *Pyrex*, timbangan digital merk *Mettler Toledo*, nampan, spatula, *shaker incubator* merk *SI-600R*, inkubator merk *Memmert*, jarum loop, bunsen, *sentrifuse* merk *Sartorius Sigma 3-18K*, *sprayer*, *crushable tang*, timbangan analitik merk *Mettler Toledo*, mikroskop merk *Olympus*, *washing bottle*, *Haemocytometer*, spektrofotometer merk *Thermo Spectronic*.

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksploratif untuk mencapai tujuan yang utama yaitu untuk mengetahui karakteristik aktivitas enzim proteolitik kasar *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri asin. Metode eksploratif yaitu penelitian dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus, yang masih kurang diketahui orang. Penelitian jenis ini bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai suatu gejala tertentu, atau mendapatkan ide-ide baru

mengenai gejala itu dengan maksud untuk merumuskan masalahnya secara lebih terperinci. Dalam hal ini, masalahnya sangat terbuka dan belum ada hipotesa, penelitian ini juga bertujuan untuk memformulasikan pertanyaan penelitian yang lebih tepat, sehingga hasil penelitian nanti dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan selanjutnya di masa mendatang.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Kultur Stok isolat (Downes dan Ito, 2001)

Pembuatan kultur stok isolat ini menggunakan metode Downes dan Ito (2001). Media yang digunakan adalah *Nutrient Agar* ditambahkan dengan kasein sebanyak 5 mL. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit kemudian dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml, dibiarkan padat pada posisi miring dengan kemiringan $\pm 30^{\circ}$ agar permukaan dari media tersebut menjadi lebar. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian media digores dengan 1 loop isolat mikroba secara aseptis dengan metode gores secara zig zag. Kultur stok disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C. Langkah-langkah dan diagram alir pembuatan kultur stok dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.2 Kurva Pertumbuhan (Metode Kosim dan Putra, 2009)

Pembuatan kurva pertumbuhan ini menggunakan metode Kosim dan Putra (2009). Bakteri *Bacillus pumilus* diambil sebanyak 1 ose dari stok biakan bakteri, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 mL larutan Na-fis 0,9%, kemudian dibandingkan dengan Mc. Farland. Dalam penelitian ini, 1 mL Na-fis 0,9% yang ditambah ke dalam bakteri *Bacillus pumilus* terlihat lebih keruh dari Mc. Farland, hal ini berarti kepadatan bakteri tersebut lebih padat daripada Mc. Farland oleh karena itu ditambahkan lagi larutan Na-fis 0,9% sampai tingkat

kekeruhannya sama atau hampir sama dengan Mc. Sampel diambil 1 mL bakteri sebagai starter, dimasukkan ke dalam 100 mL media *Nutrient broth* (NB) yang mengandung 1 gr kasein. Starter diinkubasi dalam *shaker incubator* pada kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya diambil setiap 2 jam sekali, dengan 3 perhitungan yaitu: Gravitimetri dengan kertas saring, Optical Densitas (OD) dengan spektrofotometer panjang gelombang 660 nm, dan perhitungan langsung dengan *Haemocytometer*, kemudian hasil akhir dari penelitian dibuat kurva pertumbuhannya. Langkah-langkah dan diagram alir kurva pertumbuhan dapat dilihat pada Lampiran 2.

Perhitungan gravimetri dengan kertas saring menggunakan metode Kosim dan Putra (2009) yaitu metode pengendapan. Prinsip dasar Metode gravimetri yaitu dengan memisahkan partikel-partikel yang lebih besar dengan partikel-partikel yang lebih kecil menggunakan kertas saring. Kertas saring Whatman no. 42 dikeringkan terlebih dahulu dan dihitung sebagai berat awal. Media *Nutrient broth* (NB) dan bakteri yang telah di *shaker incubator* lalu dilakukan penyaringan untuk memisahkan substrat dan endapan, kemudian kertas saring dikeringkan lagi dan dihitung sebagai berat akhir. Langkah-langkah analisa gravimetri dapat dilihat pada Lampiran 8.

Perhitungan *Optical Density* (OD) menggunakan metode Kosim dan Putra (2009). Perhitungan ini menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm. Prinsip kerja pada metode ini untuk menentukan konsentrasi senyawa-senyawa yang menyerap radiasi pada sinar UV. Hasil dari media *Nutrient broth* (NB) yang telah ditambahkan bakteri *Bacillus pumilus* dimasukkan kedalam kuvet, kemudian dimasukkan kedalam spektrofotometer lalu dilihat nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 660 nm. Langkah-langkah analisa *Optical Dencity* (OD) dapat dilihat pada Lampiran 9.

Perhitungan langsung dengan menggunakan *Haemocytometer* menggunakan metode Kosim dan Putra (2009). Perhitungan pada metode ini dilakukan dengan cara menghitung secara langsung menggunakan alat yaitu *Haemocytometer* atau *hauser chamber* dengan bantuan mikroskop. Hasil dari media *Nutrient broth* (NB) dengan bakteri *Bacillus pumilus* yang telah di *shaker incubator* ditaruh satu tetes pada *Haemocytometer* atau *hauser chamber*, kemudian didiamkan beberapa saat sampai merata, lalu dihitung dengan bantuan mikroskop. Langkah-langkah analisa perhitungan langsung dapat dilihat pada Lampiran 10.

3.3.3 Produksi Enzim (Metode Sumardi dan Lengkona, 2009)

Produksi enzim pada penelitian ini menggunakan metode Sumardi dan Lengkona (2009). Produksi enzim dapat dilakukan dengan cara mengisolat bakteri proteolitik yang telah didapatkan dari fase log yang dilihat pada kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus pumilus* selama 24 jam. Kultur stok dari fase log tersebut diambil sebanyak 2,5 mL untuk dijadikan starter, kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* selama ± 10 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm. Starter disaring dengan kertas saring Whatman no. 42 dan diambil substratnya, diinkubasi selama 24 jam pada inkubator suhu 37°C . Starter disentrifuse dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4°C sehingga terbentuk cairan supernatan enzim. Supernatan enzim yang diperoleh tersebut kemudian disimpan dalam medium penyimpanan pada suhu 4°C untuk digunakan dalam pengujian aktivitas enzim protease. Langkah-langkah produksi enzim (*crude enzim*) dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.3.4 Pengujian aktivitas protease (Metode Walter, 1984)

Pengujian aktivitas protease menggunakan metode Walter (1984), adapun langkah kerjanya dalam pengujian aktivitas protease dengan menggunakan spektrofotometer sebagai berikut: Buffer fosphat 0,01 M sebanyak 0,5 mL

dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing blanko, standar, sampel. Blanko, standar dan sampel ditambahkan substrat kasein 20 mg/mL sebanyak 0,5 mL, kemudian untuk tabung reaksi sampel ditambahkan enzim sebanyak 0,1 mL, tabung reaksi standar ditambahkan tirosin standar 5 $\mu\text{mol/mL}$ dan untuk tabung reaksi blanko ditambahkan akuades sebanyak 0,1 mL. Ketiga tabung tersebut di vorteks dan diinkubasi di *shaker incubator* selama 10 menit dengan suhu 37°C, setelah itu ditambahkan TCA (Tri Cloro Acid) 5% pada semua tabung reaksi sebanyak 1 mL. Tabung reaksi sampel dimasukkan akuades sebanyak 0,1 mL, untuk tabung reaksi blanko dan *standart* ditambahkan enzim masing-masing sebanyak 0,1 mL. Ketiga tabung reaksi tersebut divorteks dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 10 menit pada suhu 37°C, setelah itu disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian masing-masing filtrat diambil sebanyak 0,75 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi yang baru. Filtrat yang baru dipindahkan, masing-masing ditambahkan dengan Na_2CO_3 sebanyak 2,5 mL, kemudian masing-masing ditambahkan fenol folin sebanyak 0.5 mL. Ketiga tabung reaksi tersebut di vorteks dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm. Perhitungan aktifitas protease dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$U = \frac{\text{Asp} - \text{Abl}}{\text{Ast} - \text{Abl}} \times \frac{1}{T} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

Keterangan:

U : Unit aktifitas per menit per mL enzim

Asp : Nilai absorbansi sampel

Ast : Nilai absorbansi standart

Abl : Nilai absorbansi Blanko

T : Waktu Inkubasi (menit)

3.3.4.1 Penentuan pH optimum enzim protease (Metode Walter, 1984)

Penentuan pH optimum enzim protease pada penelitian ini menggunakan metode Walter (1984) dengan menggunakan variasi pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9. pH sampel dirubah menjadi pH 4, pH 5 dan pH 6 menggunakan larutan *buffer sitrat* dan untuk merubah pH sampel menjadi pH 7, pH 8 dan pH 9 menggunakan larutan *Tris HCL*. Langkah-langkah penentuan pH optimum enzim protease dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.3.4.2 Penentuan suhu optimum enzim protease (Metode Walter, 1984)

Penentuan suhu optimum enzim protease ini menggunakan metode Walter (1984) dengan menggunakan variasi suhu 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Dari beberapa suhu tersebut diambil variasi suhu minimal sampai maksimum yaitu 20°C, 40°C, 60°C dan 80°C. Suhu sampel dirubah menjadi 20°C, 40°C, 60°C dan 80°C menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 120 menit. Langkah-langkah penentuan suhu optimum enzim protease dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.3.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Enzim Protease (Metode Walter, 1984)

Penentuan waktu inkubasi enzim protease ini menggunakan metode Walter (1984), dengan menggunakan rentang waktu antara 4 jam, 8 jam, 12 jam dan 16 jam. Sampel diinkubasi didalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm dan pada suhu 37°C. Langkah-langkah penentuan waktu inkubasi enzim protease dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.3.4.4 Penentuan K_m dan V_{maks} (Penentuan Michaelis-Menten) (Metode Walter, 1984)

Penentuan K_m dan V_{maks} ini menggunakan metode walter (1984). Penentuan K_m dan V_{maks} menggunakan kasein dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu, konsentrasi 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1% dan 1,25%. Kasein diambil dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 dan 1,25% (w/v) kemudian dicampurkan kedalam 1 mL buffer fosphat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCL

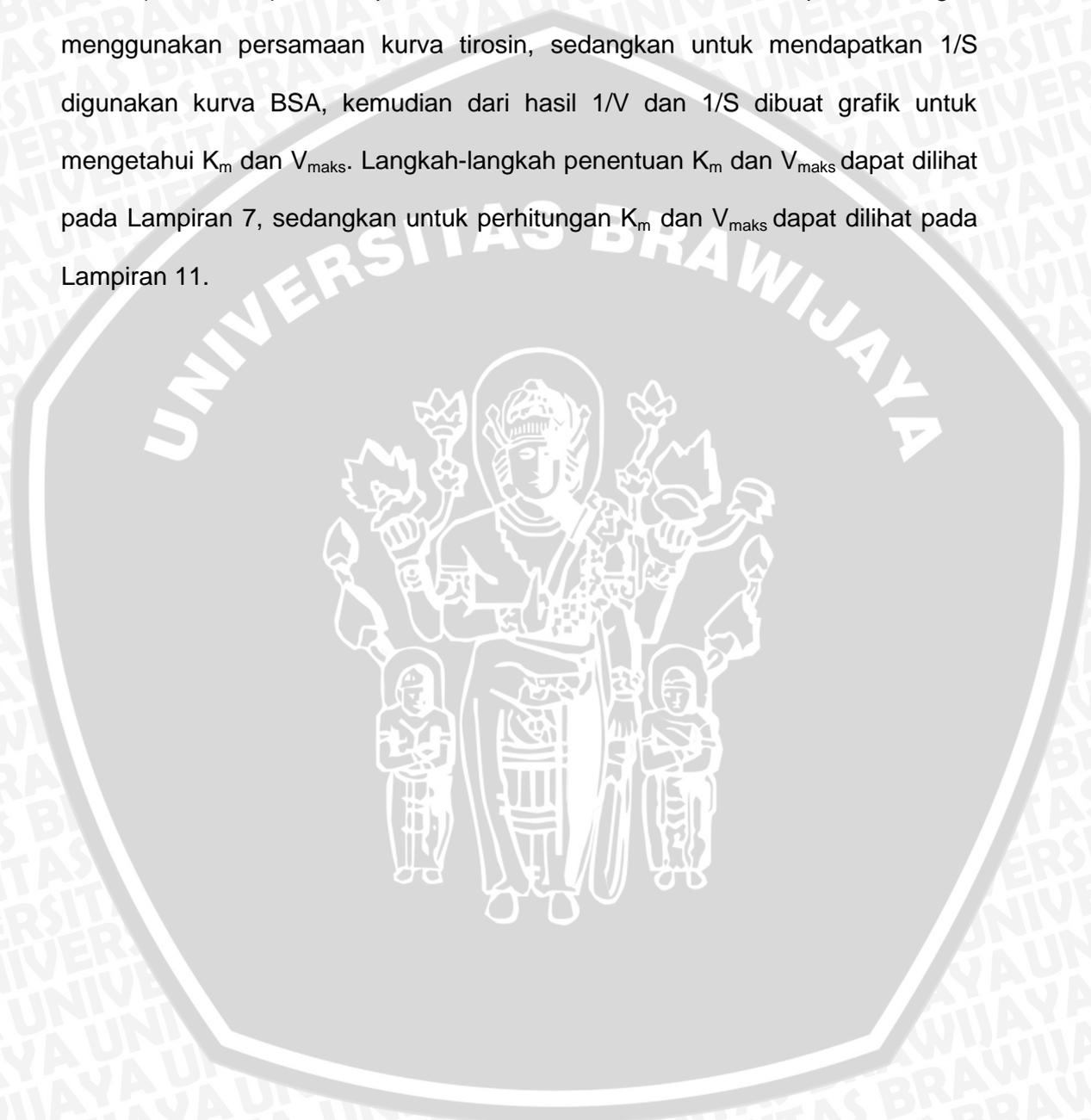
0,05 mol/L dan 0,2 mL larutan enzim protease. Campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 2 mL TCA (Tri Cloro Acid) dan 0,2 mL CaCl₂ mmol/L, didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, diambil supernatan sebanyak 1,5 mL, ditambahkan 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*, didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm.

Blanko dibuat dengan cara 1 mL buffer fosfat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCl 0,05 mol/L dan 0,2 mL aquades dicampurkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah 10 menit, larutan ditambahkan 2 mL TCA (Tri Cloro Acid) dan 0,2 mL larutan enzim protease. Larutan didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C dan dilanjutkan dengan sentrifuse pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya. Supernatan diambil sebesar 1,5 mL, kemudian dicampur dengan 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*. Larutan didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm.

Standar dibuat dengan cara 1 mL buffer fosfat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCl 0,05 mol/L dan 0,2 mL tirosin standar dicampurkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah 10 menit, larutan ditambahkan 2 mL TCA (Tri Cloro Acid) dan 0,2 mL larutan enzim protease. Larutan didiamkan lagi selama 10 menit pada suhu 37°C dan dilanjutkan dengan sentrifuse pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil supernatannya. Supernatan diambil sebanyak 1,5 mL, kemudian dicampur dengan 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*. Larutan didiamkan selama 20 menit

pada suhu 37°C, dan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

Nilai K_m dan V_{maks} ditentukan dari grafik *plot Lineweaver-Burk* laju reaksi enzim (maksimum) terhadap konsentrasi substrat. Nilai $1/V$ didapatkan dengan menggunakan persamaan kurva tirosin, sedangkan untuk mendapatkan $1/S$ digunakan kurva BSA, kemudian dari hasil $1/V$ dan $1/S$ dibuat grafik untuk mengetahui K_m dan V_{maks} . Langkah-langkah penentuan K_m dan V_{maks} dapat dilihat pada Lampiran 7, sedangkan untuk perhitungan K_m dan V_{maks} dapat dilihat pada Lampiran 11.



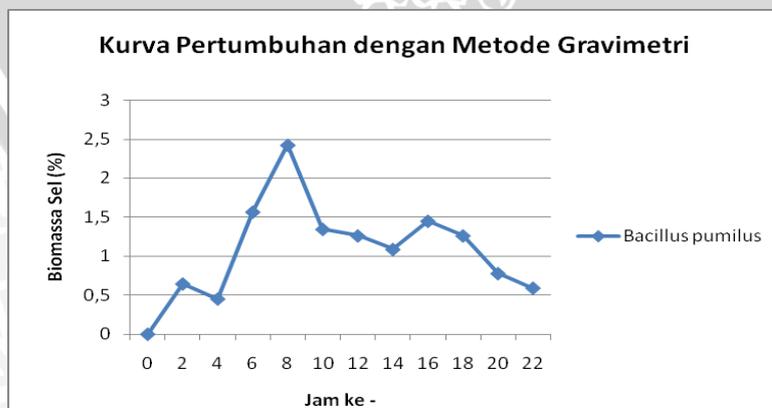
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Bakteri *Bacillus pumilus* yang digunakan dalam produksi enzim adalah bakteri pada saat fase log sehingga perlu dibuat kurva pertumbuhannya. Analisa yang dilakukan pada kurva pertumbuhan bakteri ini menggunakan tiga metode yang berbeda yaitu gravimetri dengan kertas saring, *optical density* dengan spektrofotometer 660 nm, hitung langsung dengan Haemocytometer setiap 2 jam sekali selama 24 jam. Hal ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan hasil yang terbaik dan untuk mengetahui pengaruh lingkungan terhadap jenis dan pertumbuhan bakteri.

4.1.1 Kurva Pertumbuhan (Metode Gravimetri)

Dalam analisa gravimetri yang dihitung adalah bagian berat dari zat yang dianalisa yang terdapat dalam sampel. Rumus perhitungan yang digunakan pada analisa gravimetri adalah berat akhir dikurangi berat awal kemudian dikalikan 100%. Hasil tersebut yang digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan. Data kurva pertumbuhan dengan metode gravimetri dengan kertas saring dapat dilihat pada Gambar 2.



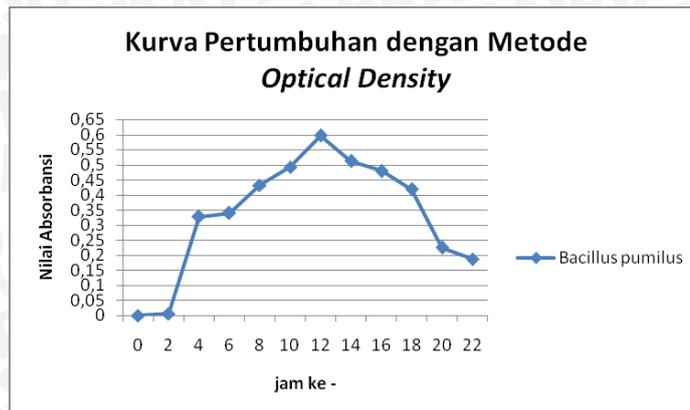
Gambar 2. Jumlah Bakteri dengan Metode Gravimetri

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus pumilus* pada Gambar 2, dapat dilihat bahwa *Bacillus pumilus* melakukan adaptasi selama ± 4 jam. Waktu adaptasi ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan media starter untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan media produksi, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen (Kosim dan Putra, 2010).

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-8 dengan biomassa sel maksimum sebesar 2,425%. Hal ini berarti pada penelitian ini dengan menggunakan metode gravimetri, bakteri *bacillus pumilus* memiliki jumlah kepadatan tertinggi pada jam ke-8. Hasil dari penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan 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 menggunakan media SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1% dan parafin cair 1%.

4.1.2 Kurva Pertumbuhan (Metode *Optical Density*)

Kurva pertumbuhan dengan metode *Optical Density* menggunakan alat yang dinamakan spektrofotometer. Data hasil analisa kurva pertumbuhan dengan metode *Optical Density* dapat dilihat pada Gambar 3.

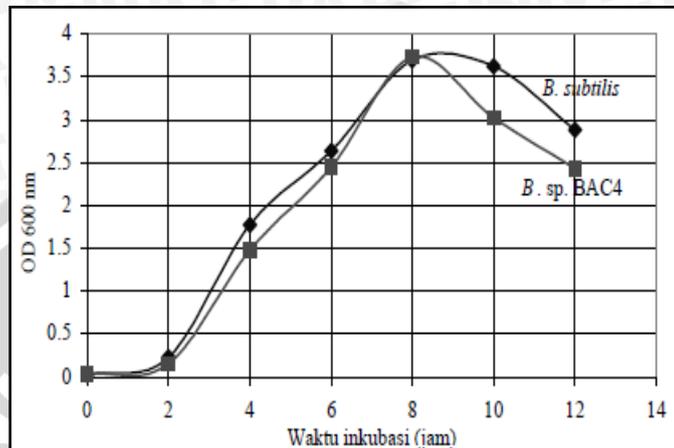


Gambar 3. Jumlah Bakteri dengan Metode *Optical Density*

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus pumilus* pada Gambar 3, dapat dilihat bahwa *Bacillus pumilus* melakukan adaptasi selama ± 2 jam. 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-12 dengan nilai absorbansi maksimum sebesar 0,597, hal ini berarti pada penelitian ini dengan menggunakan metode *Optical Density*, bakteri *Bacillus pumilus* memiliki kepadatan tertinggi pada jam ke-12. Kerapatan optik menurun setelah jam ke-12. Pada fase ini bakteri mulai memasuki fase kematian. Kematian ini terjadi karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah bertimbun dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya.

Pengamatan terhadap kurva pertumbuhan juga telah dilakukan oleh Susanti (2003) dimana fase lognya terjadi pada jam ke-8. Data densitas optik pada Gambar 4 menunjukkan perbedaan dimana pada kurva pertumbuhan yang diteliti oleh Susanti memiliki rentang densitas optik antara 0-4, sedangkan pada penelitian ini hanya berada pada rentang 0-0,6. Perbedaan yang signifikan ini

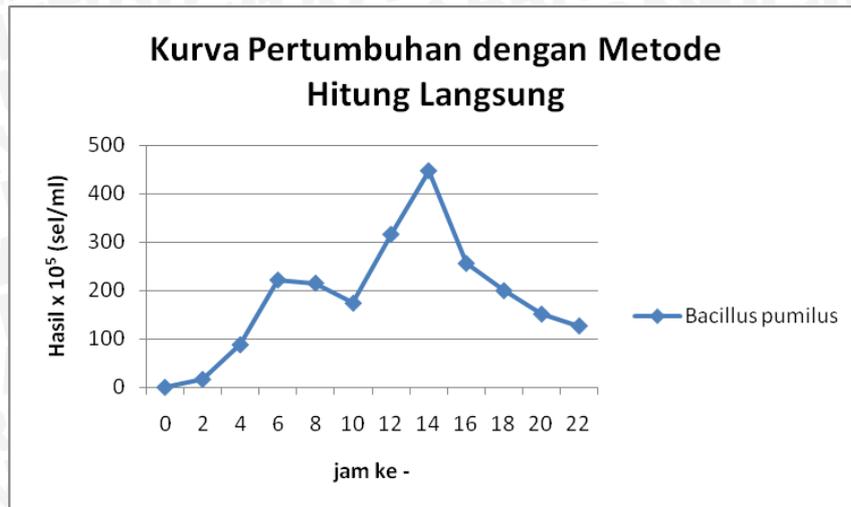
diduga terjadi karena medium dan spesies bakteri yang digunakan pada penelitian Susanti berbeda dengan penelitian ini. Selain itu, pada penelitian susanti, panjang gelombang yang digunakan dalam pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 600 nm.



Gambar 4. Jumlah Bakteri *Bacillus subtilis*
(Susanti, 2003 dalam Kosim dan Putra, 2009)

4.1.3 Kurva Pertumbuhan (Metode Hitung Langsung)

Kurva pertumbuhan dengan metode hitung secara langsung atau metode Haemocytometer yaitu metode yang menggunakan *hemocytometer* dan mikroskop. Prinsip dasar metode *haemocytometer* yaitu penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah *Petroff-Hauser Chamber* atau *Haemocytometer*. Data hasil analisa kurva pertumbuhan dengan metode hitung langsung dapat dilihat pada Gambar 5.



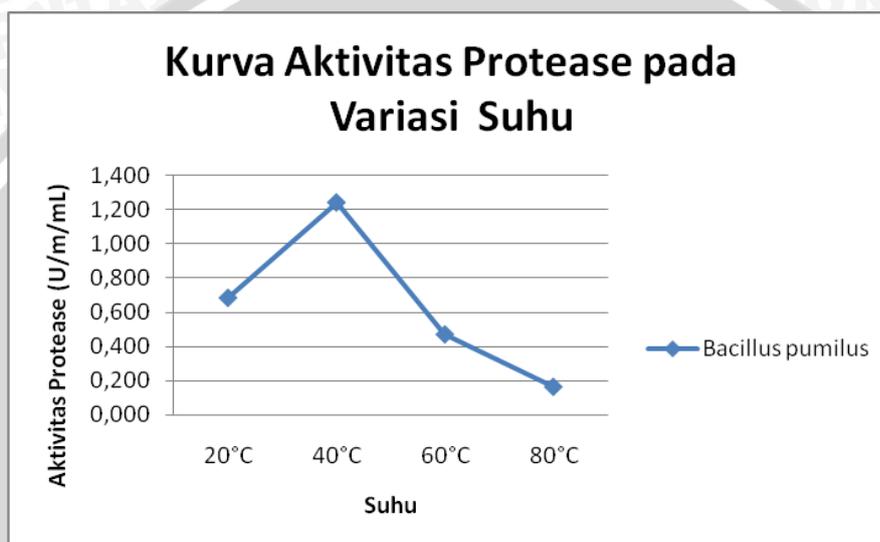
Gambar 5. Jumlah Bakteri dengan Metode Hitung Langsung

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus pumilus* pada Gambar 5, dapat dilihat bahwa *Bacillus pumilus* melakukan adaptasi selama ± 2 jam. 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-14 dengan jumlah bakteri maksimum sebesar 448×10^5 sel/mL.

Dari ketiga metode yang digunakan, fase log yang didapatkan berbeda-beda yaitu, metode gravimetri pada jam ke-8, metode *Optical Density* pada jam ke-12 dan metode hitung langsung pada jam ke-14. Perbedaan tersebut diduga terjadi karena metode perhitungannya berbeda sehingga tingkat kesalahan perhitungan pada metode-metode tersebut berbeda-beda. Dari penelitian ini didapatkan data terbaik dengan menggunakan metode *Optical Density* karena pada metode ini paling sedikit tingkat kesalahan perhitungannya.

4.2. Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan Suhu

Analisa yang dilakukan pada perlakuan suhu ini menggunakan empat suhu yang berbeda yaitu 20°C, 40°C, 60°C, 80°C dengan dua kali pengulangan. Hal ini dilakukan untuk mengetahui suhu optimum yang terjadi pada aktivitas protease *Bacillus pumilus*. Data hasil analisa aktivitas protease dengan perlakuan suhu yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Aktivitas Protease pada Variasi Suhu

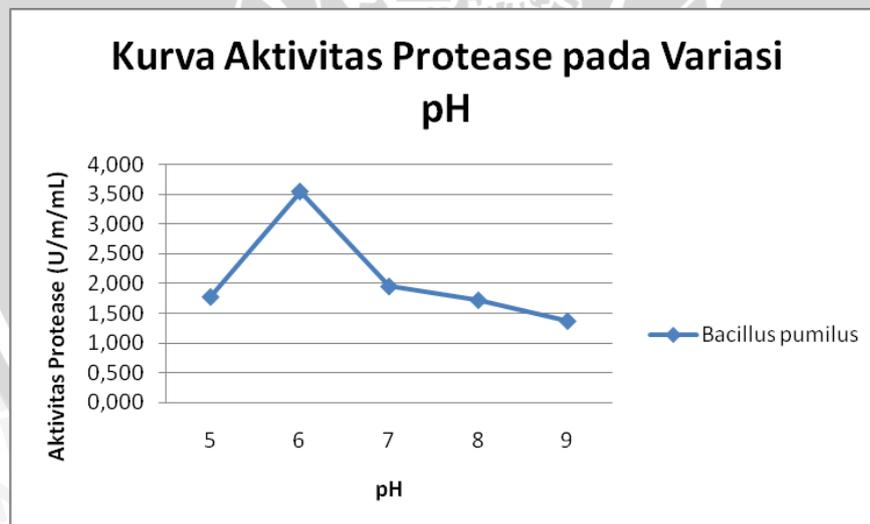
Berdasarkan Gambar 6, terlihat bahwa suhu optimumnya terjadi pada suhu 40°C dan memiliki aktivitas protease *Bacillus pumilus* optimum sebesar 1,241 Unit/m/mL yang berarti setiap 1 mL enzim protease mampu memecah kasein sehingga menghasilkan 1,241 µmol enzim per menit. Bakteri *Bacillus pumilus* ini merupakan bakteri termofilik karena bakteri termofilik adalah bakteri yang mampu tumbuh pada suhu 40°C - 70°C dan suhu optimum pada penelitian ini berada pada suhu 40°C. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Novita, *et. al.*, (2006) yang menggunakan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* dengan medium sintetik yang terdiri dari agar, nutrisi agar, pepton, glukosa, ekstrak yeast, NaCl, susu skim, memiliki nilai aktivitas protease terbesar pada perlakuan suhu 50°C (0,516 Unit/mL). Perbedaan tersebut diduga

karena spesies dan media pertumbuhan yang digunakan berbeda dengan penelitian ini. Perhitungan aktivitas enzim pada perlakuan suhu yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 12.

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 kerusakan enzim.

4.3 Hasil Analisa Aktivitas Protease pada Perlakuan pH

Analisa yang dilakukan pada perlakuan pH ini menggunakan lima pH yang berbeda yaitu pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 dengan dua kali pengulangan. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pH optimum pada bakteri *Bacillus pumilus*. Data hasil analisa aktivitas protease dengan perlakuan pH yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Aktivitas Protease pada Variasi pH

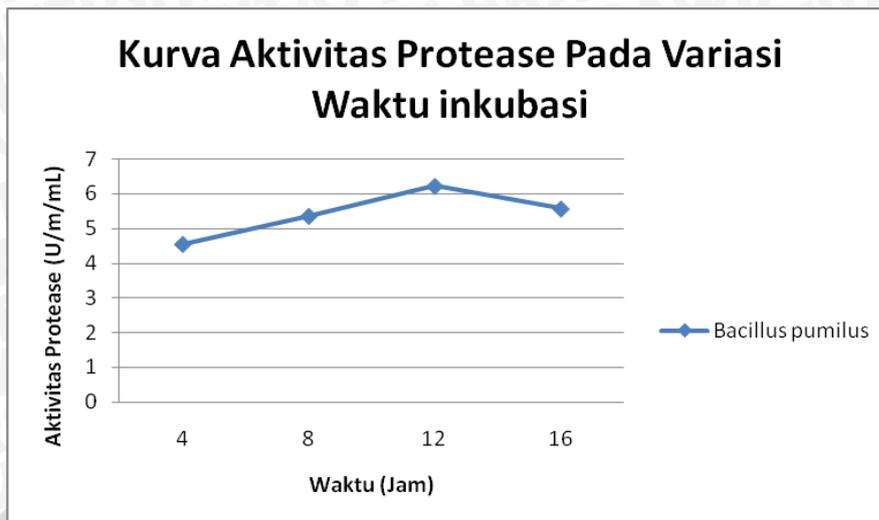
Data pada Gambar 7, aktivitas protease isolat terlihat meningkat mulai dari pH 5 – pH 6,0 dan mulai menurun pada pH 7,0 – pH 9,0. pH optimum dari enzim protease dicapai pada pH 6 dengan aktivitas sebesar 3,546 Unit/m/mL yang

berarti setiap 1 mL enzim protease mampu memecah casein sehingga menghasilkan 3,546 μmol enzim per menit. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Sumarlin (2010), didapatkan pH optimum dari bakteri *Bacillus circulans* pada pH 9 dengan menggunakan media air rendaman kedelai. Perbedaan pH maksimum ini diduga karena spesies bakteri dan media pertumbuhan yang digunakan berbeda. Perhitungan aktivitas enzim pada perlakuan pH yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 13.

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 (Pelczar dan Chan, 1986). 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. (Hidayat, 2005).

4.4 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan Waktu Inkubasi

Analisa yang dilakukan pada perlakuan waktu inkubasi ini menggunakan empat waktu yang berbeda yaitu 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam dengan dua kali pengulangan. Hal ini dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi optimum yang terjadi pada aktivitas protease *Bacillus pumilus*. Data hasil analisa aktivitas protease dengan perlakuan waktu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Aktivitas Protease Pada Variasi Waktu inkubasi

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan didapatkan aktivitas enzim protease optimum pada waktu inkubasi 12 jam yaitu sebesar 6,222 Unit/menit/mL yang berarti setiap 1 mL enzim protease mampu memecah kasein sehingga menghasilkan 6,222 μmol enzim per menit. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Susanti (2002), yang melakukan pengamatan terhadap bakteri *Bacillus subtilis* didapatkan aktivitas protease optimum pada waktu inkubasi 8 jam. Perbedaan waktu inkubasi ini diduga karena spesies bakteri yang digunakan berbeda. Perhitungan aktivitas enzim pada variasi waktu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada Lampiran 14.

Aktivitas protease dengan perlakuan waktu inkubasi cenderung mengalami peningkatan seiring semakin lama waktu inkubasi yang digunakan, hal ini disebabkan pertumbuhan bakteri mengalami perkembangan cepat maka aktivitas tertinggi tersebut selama 12 jam. Sintesis enzim-enzim ekstraseluler biasanya mengikuti salah satu dari dua pola umum yang ada. Pada pola yang pertama yaitu sintesa dan sekresi enzim ekstraseluler meningkat seiring dengan pertumbuhan sel (fase eksponensial) dan mengalami penurunan pada waktu sel

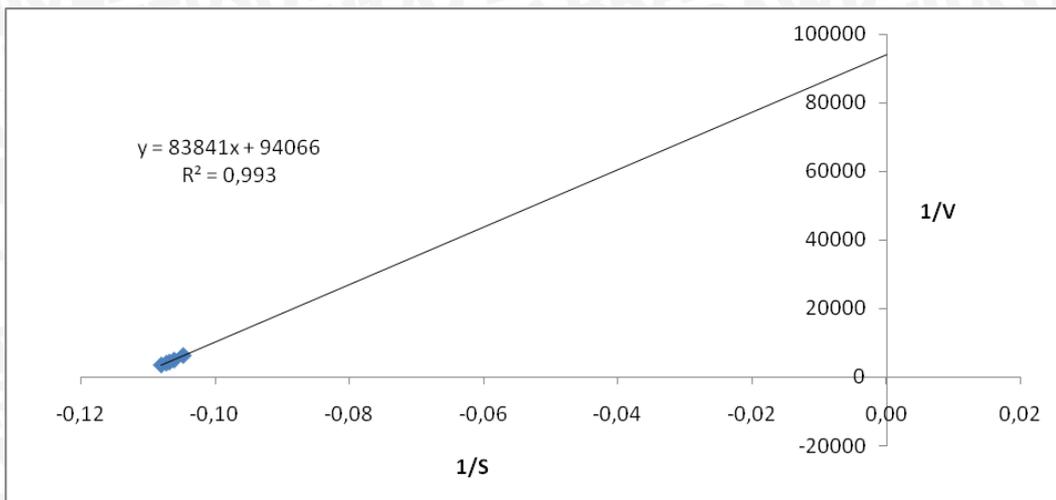
mencapai fase stasioner. Pola yang kedua yaitu enzim ekstraseluler disintesa dengan kecepatan minimal selama fase eksponensial dan selanjutnya akumulasi enzim terjadi pada fase stasioner (Widhyastuti, *et. al.*, 2002)

4.5 Penentuan V_{maks} dan K_m

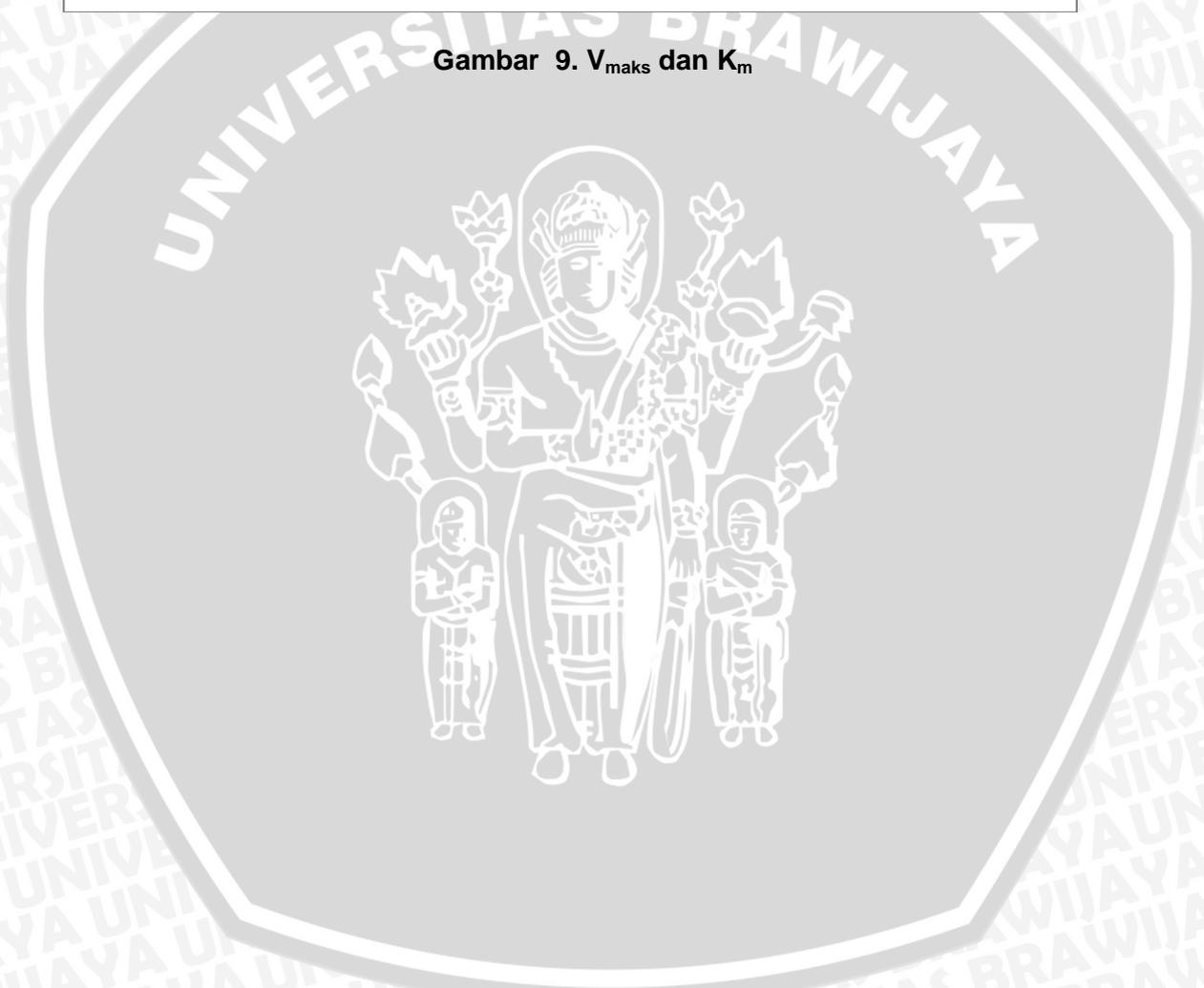
V_{maks} (maximum velocity) merupakan kecepatan maksimum reaksi enzim pada saat konsentrasi substrat dalam keadaan jenuh. Berarti kecepatan maksimum reaksi enzim protease pada saat konsentrasi substrat jenuh adalah $0,0110918 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. K_m (konstanta Michaelis-Menten) adalah konsentrasi substrat yang dibutuhkan pada saat setengah reaksi maksimum. Berarti konsentrasi substrat (kasein) yang dibutuhkan agar mencapai setengah reaksi maksimum pada enzim protease adalah $889,3375 \text{ mM}$. Perhitungan penentuan nilai V_{maks} dan K_m dapat dilihat pada Lampiran 11.

Nilai kecepatan reaksi maksimum (V_{maks}) yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah bila dibandingkan dengan penelitian Agustini, (2006) yang menggunakan *Bacillus caldoolyolyticus* memiliki nilai V_{maks} sebesar $0,622 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Perbedaan ini diduga karena enzim protease yang diteliti masih belum dimurnikan. Kinetika reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh kemurnian substrat. Apabila substrat tidak murni, maka kinetika enzimatik akan berjalan lambat atau terhambat.

Nilai K_m yang diperoleh pada penelitian ini jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Agustini, (2006) yaitu $0,0098 \text{ mM}$. Perbedaan ini diduga karena media dan spesies bakteri yang digunakan berbeda. Gambar grafik V_{maks} dan K_m dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. V_{maks} dan K_m



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus pumilus* yang diisolasi dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin memiliki fase log pada jam ke-12 dengan nilai absorbansi sebesar 0,597, suhu optimum pada suhu 40°C dengan aktivitas protease sebesar 1,241 U/menit/mL, pH optimum pada pH 6 dengan aktivitas protease sebesar 3,546 U/menit/mL, waktu inkubasi pada jam ke-12 dengan aktivitas protease sebesar 6,222 U/menit/mL dan mempunyai nilai V_{maks} sebesar 0,0110918 $\text{mM L}^{-1} \text{min}^{-1}$ dan K_m sebesar 889,3375 mM.

5.2 Saran

Disarankan perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian enzim protease *Bacillus pumilus* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin, sehingga hasil aktivitas enzim protease yang didapatkan lebih murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, R. 2006. *The Utilization Of Thermophilic Protease Which Life In Hot Spring Cangar Batu Malang. Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences. State University of Surabaya. Surabaya. Indonesia*
- Andriyani, D. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Halofilik dari Ikan Asin. <http://google/halofilik/IkanAsin.php>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 12.00 WIB
- Anonymous. 2010. Aktivitas Biokimia Mikroorganisme. <http://www.docstoc.com/docs/22705369/AKTIVITAS-BIOKIMIA-MIKROORGANISME-Bakteri-memiliki-berbagai/>. Diakses 30 Januari 2010 Pukul 12.00 WIB
- Baehaki A., T. Nurhayati, Suhartono, M. Thenawidjaja. 2005. Karakteristik Protease dari Bakteri Patogen *Staphylococcus epidermis*. Buletin Teknologi Hasil Perikanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet and M. Wootton. 2007. Ilmu Pangan. Penerjemah H. Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Downes, F. P. and K. Ito. 2001. *Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Food. American Public Health Association. Washington, D. C*
- Falch, E.A. 1991. *Industrial Enzyrres development in Production and Application. Biotech. Adv. 9:643-658*
- Fardiaz, I. 1992. Mikrobiologi Pangan I. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Fatimah, Irma. 2005. Isolasi Bakteri Proteolitik dari Pencernaan Ikan Nila Galur Gift (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas) dan Karakterisasi Protease Ekstraselulernya. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor
- Fox, P.F. 1991. Food Enzimology. Volumel. Elsevier Applied Science. New York
- Hanum, D.R. 2009. Seleksi dan identifikasi isolat bakteri halofilik penghasil enzim amilase dan protease dari asinan sawi. <http://google/halofilik/protease.php>. Diakses 30 Agustus 2011. Pukul 12.00 WIB
- Hidayat I. 2005. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Endo-1,4- β -Glukanase *Bacillus* sp. AR 009. Bidang Mikrobiologi. Pusat Penelitian Biologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Bogor. 16002
- Hurrigan. W.F and E. Margaret. 1976. *Laboratory Methods in Food and Diary Microbiology. Academic Press. San Francisco*

- Judoamidjojo M., A. A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1990. Teknologi Fermentasi. PAU-Bioteknologi IPB. Bogor
- Kamelia, R., M. Sindumarta dan D. Natalia. 2005. Isolasi dan Karakteristik Protease Intraseluler Termotabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus*. Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung. Bandung
- Khopkar S. 2003. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta : Universitas Indonesia (UI-Press)
- Kosim dan Putra. S.R. 2010. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. FMIPA - ITS. Surabaya
- Maharani, N. 2005. Pengaruh Penambahan Bakteri Gram Positif Hasil Isolasi dari Saluran Pencernaan Udang dalam Pakan untuk Meningkatkan Daya Cerna dan Pertumbuhan Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). Thesis Magister Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang
- Mangunwidjaja, D., Suryani A. 1994. Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya, Jakarta
- Moon, S.H dan S.J. Parulekar. 1993. *Some Observation on Protease Producing in Continuous Suspension Cultures of Bacillus firmus*. Biotech. Bioeng. 41:43-45
- Muchtadi, D., Palupi, N. S., dan M. Astawan. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor
- Novita, W., K. Arief, F.C. Nisa, dan U. Murdiyatmo. 2006. Karakterisasi Parsial Ekstrak Kasar Enzim Protease Dari *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396. Jurnal Teknologi Pertanian, Vol. 7 No. 2 (Agustus 2006) 96-105
- Nugroho A. 2006. Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Pengguna Hidrokarbon dengan Penambahan Variasi Sumber Karbon. Jurusan Teknik Lingkungan. Universitas Trisakti. Grogol. Jakarta Barat
- Panji, S., Paulus S., dan Fauzi. 2002. Produksi dan Stabilisasi Desaturase dari *Absidia corymbifera*, Majalah Menara Perkebunan
- Pelezar, M. J. Dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta
- Putranto., Wendy S. 2006. Purifikasi dan Karakterisasi Protease yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam Fermentasi Susu Sapi Perah. Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI
- Rao M.B, Tanksale A.M, Mohini S.G, and Deshpande V.V., 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. *Microbiology and Molekular Biology Reviews*. Hal 600-604
- Richana, N., Irawadi T.T, Nur A. dan Syamsu K. 2008. Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase Serta Karakterisasi Enzimnya. Jurnal AgroBiogen 4 (1): 24-34

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

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

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

Sumardi dan D. Lengkana. 2009. Isolasi Bacillus Penghasil Protease dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung. Skripsi: FMIPA - Unila. Bandar Lampung

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

Sumarlin, L. O. 2010. Karakteristik Protease Dari *Bacillus circulans* Pada Media Pertumbuhan Dengan pH Tidak Terkontrol. Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

Susanti, V.H. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. FKIP. Universitas Sebelas Maret Surakarta

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

Walter H. E. 1984. Proteinases (proteins as substrates). Method with haemoglobin, casein and azocoll as substrate. Di dalam Bergmeyer J, Grabl M, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Edisi ke-3. Weinheim: Verlag Chemie. hlm 270-278

Ward, O.P. 1983. *Properties of Microbial Proteinases*. Di dalam Fogarty MW, editor. *Microbial and Enzyme Technology*. New York: Applied Science Publishing. hlm. 251-305

Widhyastuti, Nunuk, Ratih M.D., Dudi T. Dan Tatik K. 2002. Aktivitas Protease Bakteri Terseleksi P.1 Pada Berbagai Media Selektif. FMIPA – Kimia IPB. Bogor

Wikipedia. 2012. Bakteri. <http://wikipedia.id/Bakteri/klasifikasibakteri.php>. Diakses 6 Juni 2012

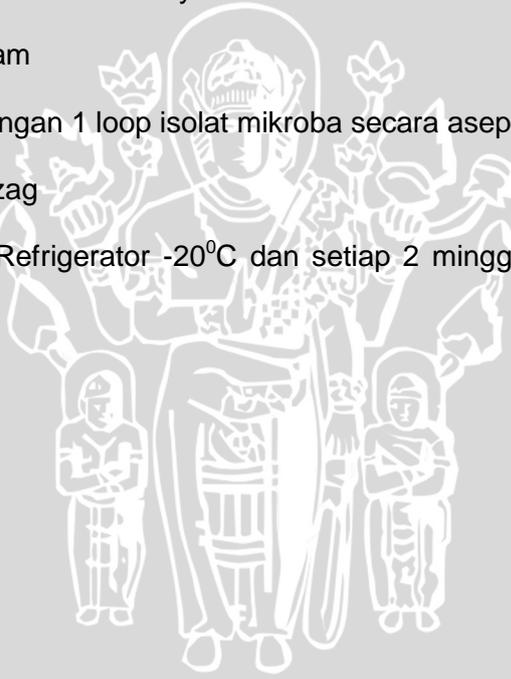
_____. 2011. *Bakteri Bacillus pumilus*. http://wikipedia.id/Bakteri_pumilus/klasifikasibakteriBacillus/image.php. Diakses 11 Desember 2011

LAMPIRAN

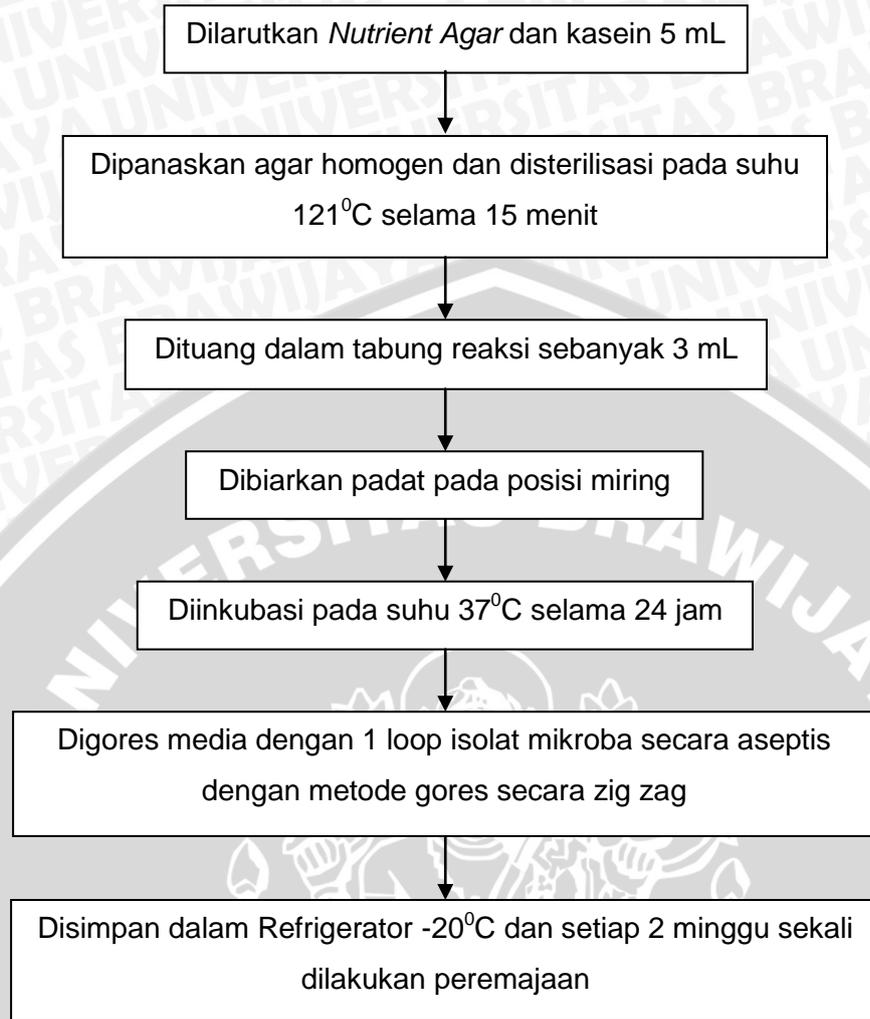
Lampiran 1. Pembuatan Kultur Stok Isolat

1.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat

- Dilarutkan *Nutrient Agar* dan kasein 5 mL
- Dipanaskan agar homogen
- Disterilisasi suhu 121^oC selama 15 menit kemudian dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL
- Dibiarkan padat pada posisi miring
- Dilakukan uji sterilisasi media yaitu media tersebut diinkubasi pada suhu 37^oC selama 24 jam
- Digores media dengan 1 loop isolat mikroba secara aseptis dengan metode gores secara zig zag
- Disimpan dalam Refrigerator -20^oC dan setiap 2 minggu sekali dilakukan peremajaan



1.2 Skema Pembuatan Kultur Stok Biakan Bakteri

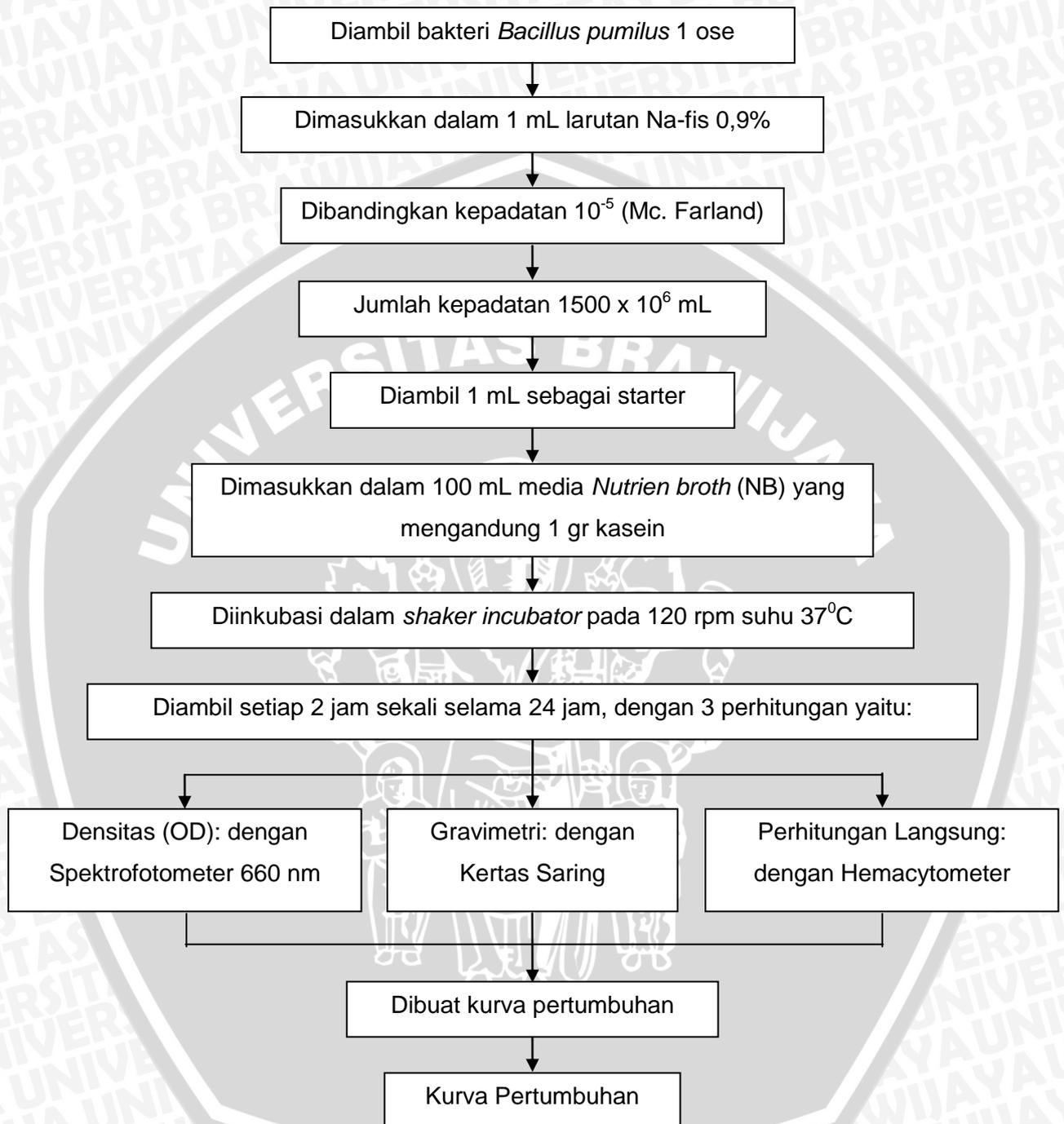


Lampiran 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

- Diambil bakteri *Bacillus pumilus* sebanyak 1 ose dari stok biakan bakteri
- Dimasukkan ke dalam 1 mL larutan Na-fis 0,9%
- Dibandingkan dengan kepadatan 10^5 (Mc. Farland) dengan jumlah kepadatan bakteri 1500×10^6 mL
- Diambil 1 mL sebagai starter
- Dimasukkan ke dalam 100 mL media *Nutrien broth* (NB) yang mengandung 1 gr kasein dan fenol folin 10mL
- Diinkubasi dalam *shaker incubator* pada kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 24 jam
- Diambil setiap 2 jam sekali, dengan 3 perhitungan yaitu:
 - Densitas (OD): dengan Spektrofotometer 660 nm
 - Gravimetri: dengan Kertas Saring
 - Perhitungan Langsung: dengan *Hemocytometer*
- Dibuat kurva pertumbuhan
- Kurva Pertumbuhan

2.2 Skema Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

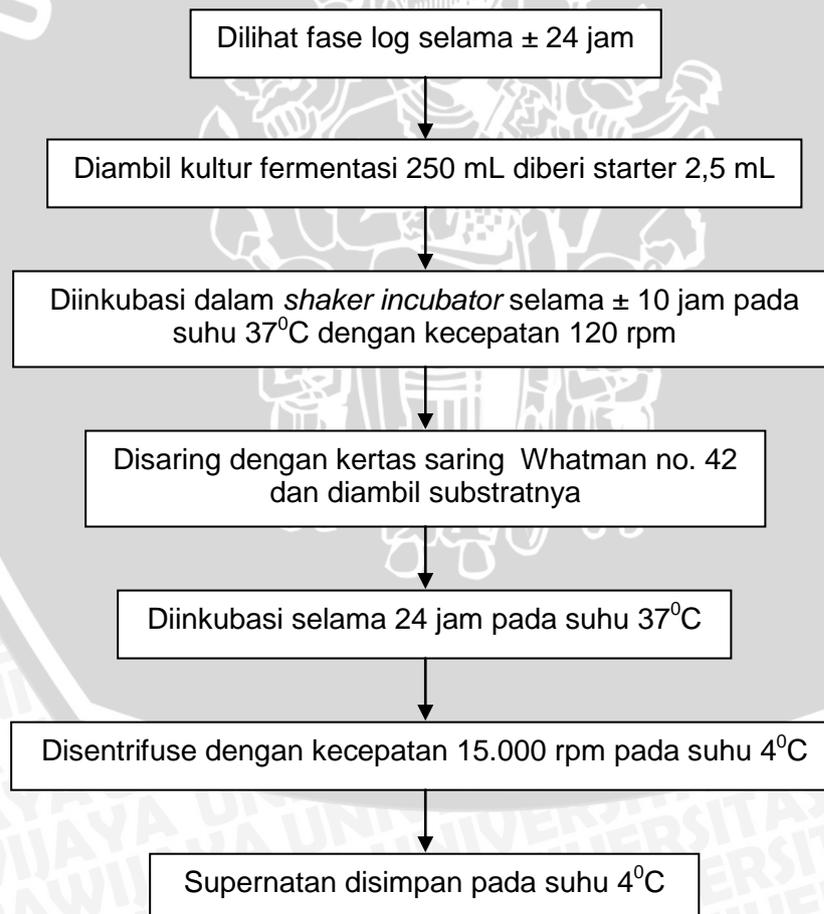


Lampiran 3. Penentuan Produksi Enzim (*crude enzim*)

3.1 Penentuan Produksi Enzim (*crude enzim*)

- Dilihat fase log selama ± 24 jam
- Diambil kultur fermentasi 250 mL diberi starter 2,5 mL
- Diinkubasi dalam *shaker incubator* selama ± 10 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm
- Disaring dengan kertas saring Whatman no. 42 dan diambil substratnya
- Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
- Disentrifuse dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4°C
- Supernatan disimpan pada suhu 4°C

3.2 Skema Penentuan Produksi Enzim (*crude enzim*)



Lampiran 4. Penentuan pH Optimum

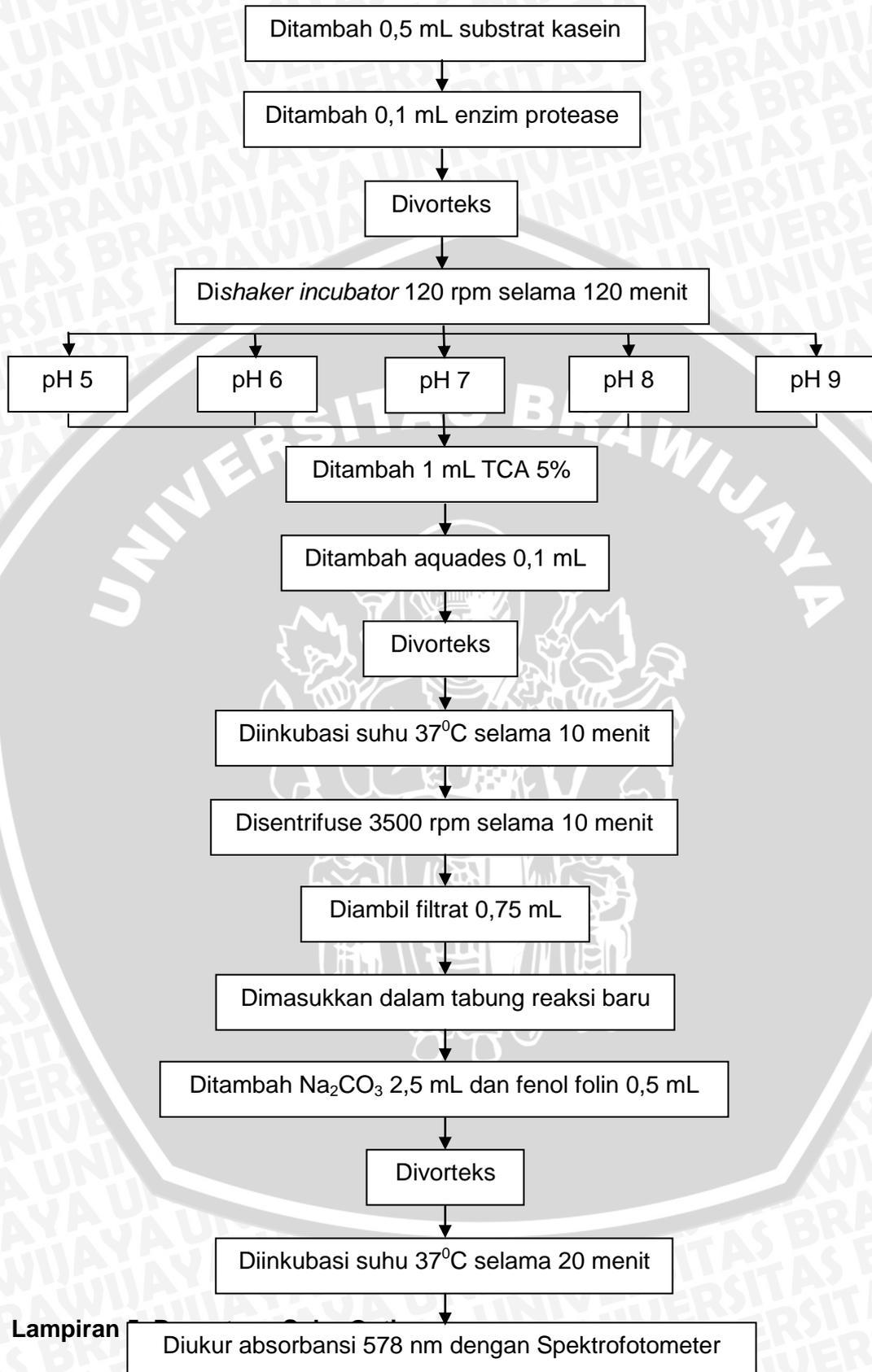
4.1 Penentuan pH Optimum

- Diambil 0,5 mL buffer fosfat 0,01M
- Ditambahkan dengan 0,5 mL substrat kasein
- Ditambahkan 0,1 mL enzim protease dan divorteks
- Diinkubasi dalam *shaker incubator* kecepatan 120 rpm selama 120 menit pada perbedaan pH 5, 6, 7, 8 dan 9
- Ditambahkan dengan 1 mL TCA (Tri Cloro Acid) 5%
- Ditambahkan aquades 0,1 mL dan divorteks
- Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 10 menit
- Disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit
- Diambil filtrat 0,75 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi baru
- Ditambahkan Na₂CO₃ 2,5 mL dan fenol folin 0,5 mL serta divorteks
- Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 20 menit
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

4.2 Skema Penentuan pH Optimum

Diambil 0,5 mL buffer fosfat 0,01 M





Lampiran

5.1 Penentuan Suhu Optimum

- Diambil 0,5 mL buffer fosphat 0,01M

- Ditambahkan dengan 0,5 mL substrat kasein
- Ditambahkan 0,1 mL enzim protease dan divorteks
- Diinkubasi dalam *shaker incubator* kecepatan 120 rpm selama 120 menit pada perbedaan suhu 20°C, 40°C, 60°C dan 80°C
- Ditambahkan dengan 1 mL TCA (Tri Cloro Acid) 5%
- Ditambahkan aquades 0,1 mL dan divorteks
- Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 10 menit
- Disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit
- Diambil fitrat 0,75 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi baru
- Ditambahkan Na₂CO₃ 2,5 mL dan fenol folin 0,5 mL serta divorteks
- Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 20 menit
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer



5.2 Skema Penentuan Suhu Optimum

Diambil 0,5 mL buffer fosphat 0,01 M

Ditambah 0,5 mL substrat kasein

Ditambah 0,1 mL enzim protease

Divorteks



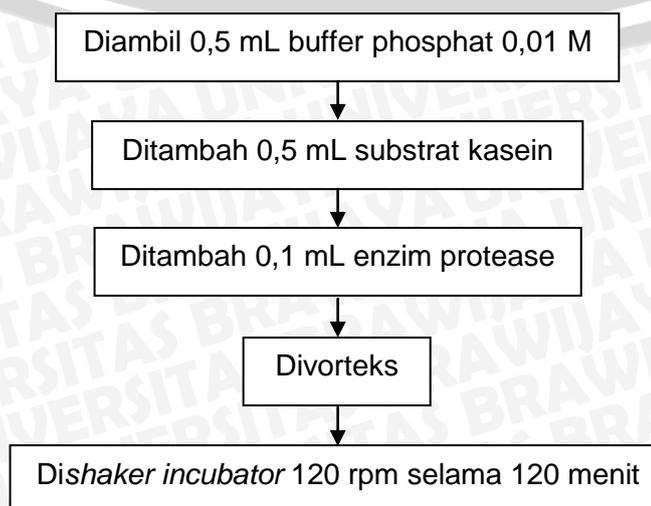
Lampiran 6. Penentuan Waktu Inkubasi

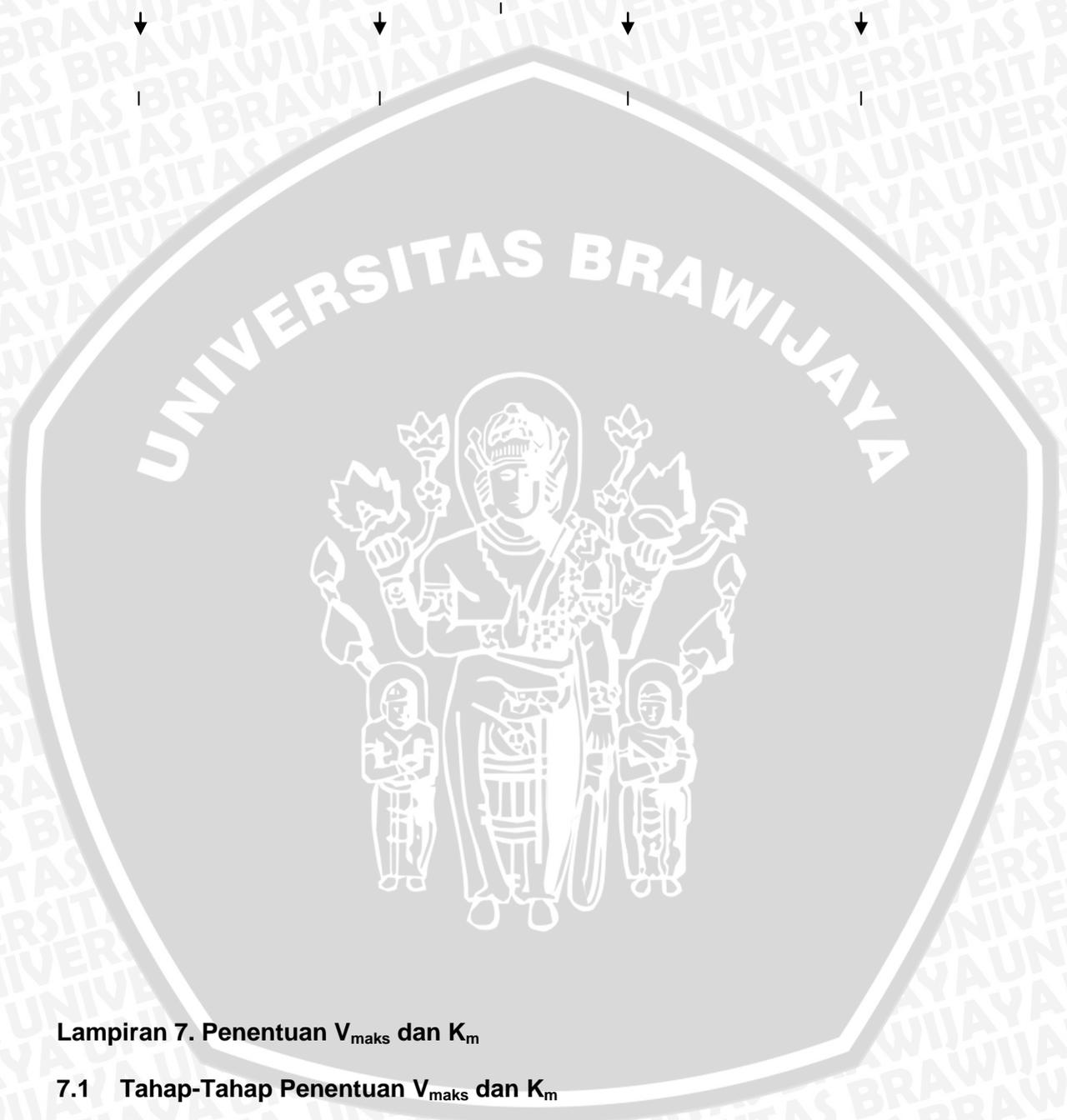
6.1 Penentuan Waktu Inkubasi

- Diambil 0,5 mL buffer fosfat 0,01M
- Ditambahkan dengan 0,5 mL substrat kasein
- Ditambahkan 0,1 mL enzim protease dan divorteks

- Diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm suhu 37°C pada perbedaan waktu inkubasi 4 jam, 8 jam, 12 jam dan 16 jam
- Ditambahkan dengan 1 mL TCA (Tri Cloro Acid) 5%
- Ditambahkan aquades 0,1 mL dan divorteks
- Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 10 menit
- Disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit
- Diambil filtrat 0,75 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi baru
- Ditambahkan Na₂CO₃ 2,5 mL dan fenol folin 0,5 mL serta divorteks
- Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 20 menit
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

6.2 Skema Penentuan Waktu Inkubasi





Lampiran 7. Penentuan V_{maks} dan K_m

7.1 Tahap-Tahap Penentuan V_{maks} dan K_m

7.1.1 Pembuatan Sampel

- Casein diambil dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 dan 1,25% (w/v) dilarutkan dalam 1 mL aquades
- Dicampurkan kedalam 1 mL buffer fosphat

- Ditambahkan 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCL 0,05 mol/L dan 0,2 mL larutan enzim protease
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C
- Ditambahkan 2 mL TCA (Tri Cloro Acid) 5% dan 0,2 mL CaCl₂ 2mmol/L
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C
- Disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatan sebanyak 1,5 mL
- Ditambahkan 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

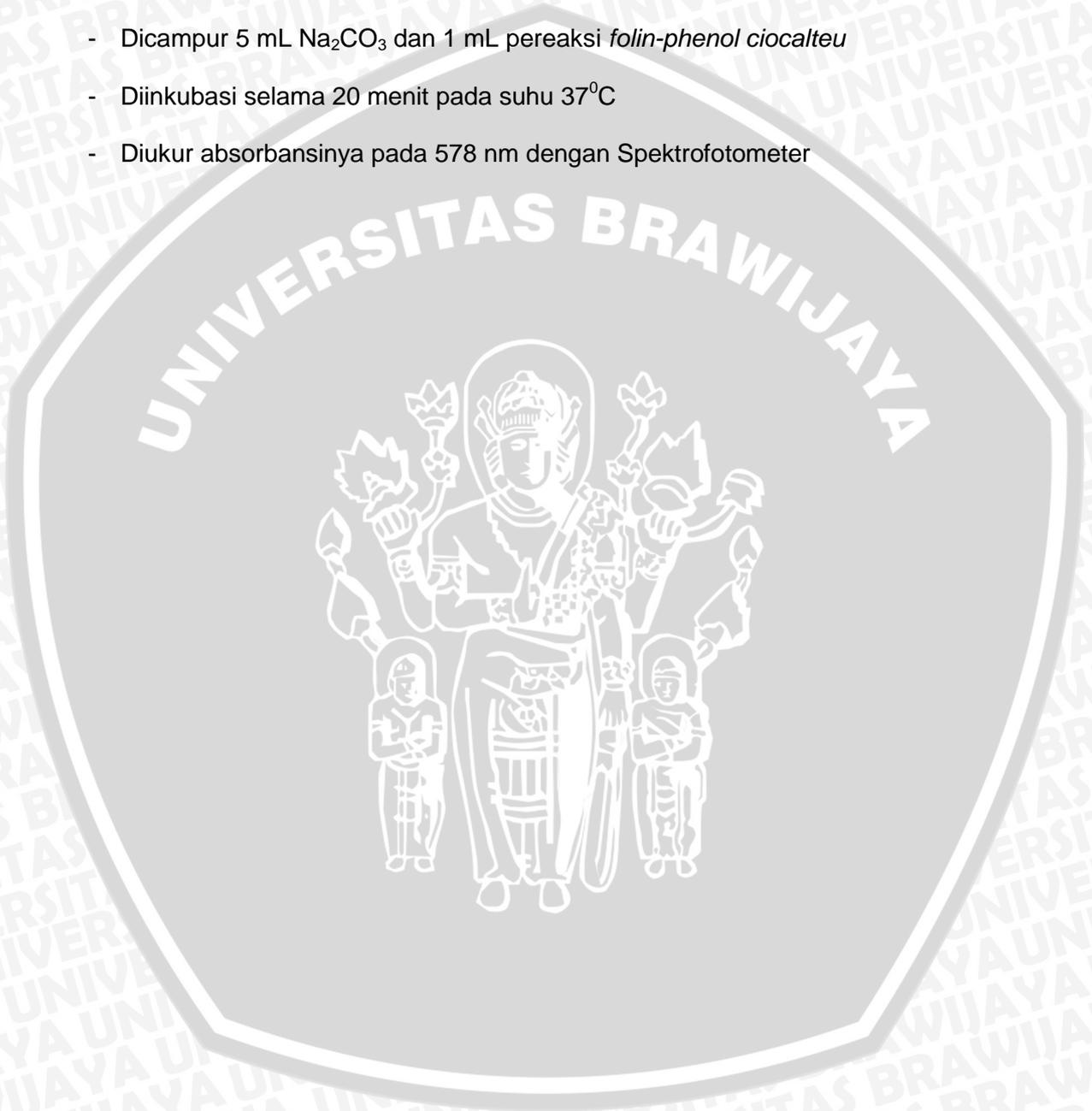
7.1.2 Pembuatan Blanko

- Dicampurkan 1 mL buffer fosfat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCl 0,05 mol/L dan 0,2 mL aquades
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C
- Ditambahkan 2 mL TCA (Tri Cloro Acid) 5% dan 0,2 mL larutan enzim protease
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C
- Disentrifuse 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatan 1,5 mL
- Dicampur 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

7.1.3 Pembuatan Standar

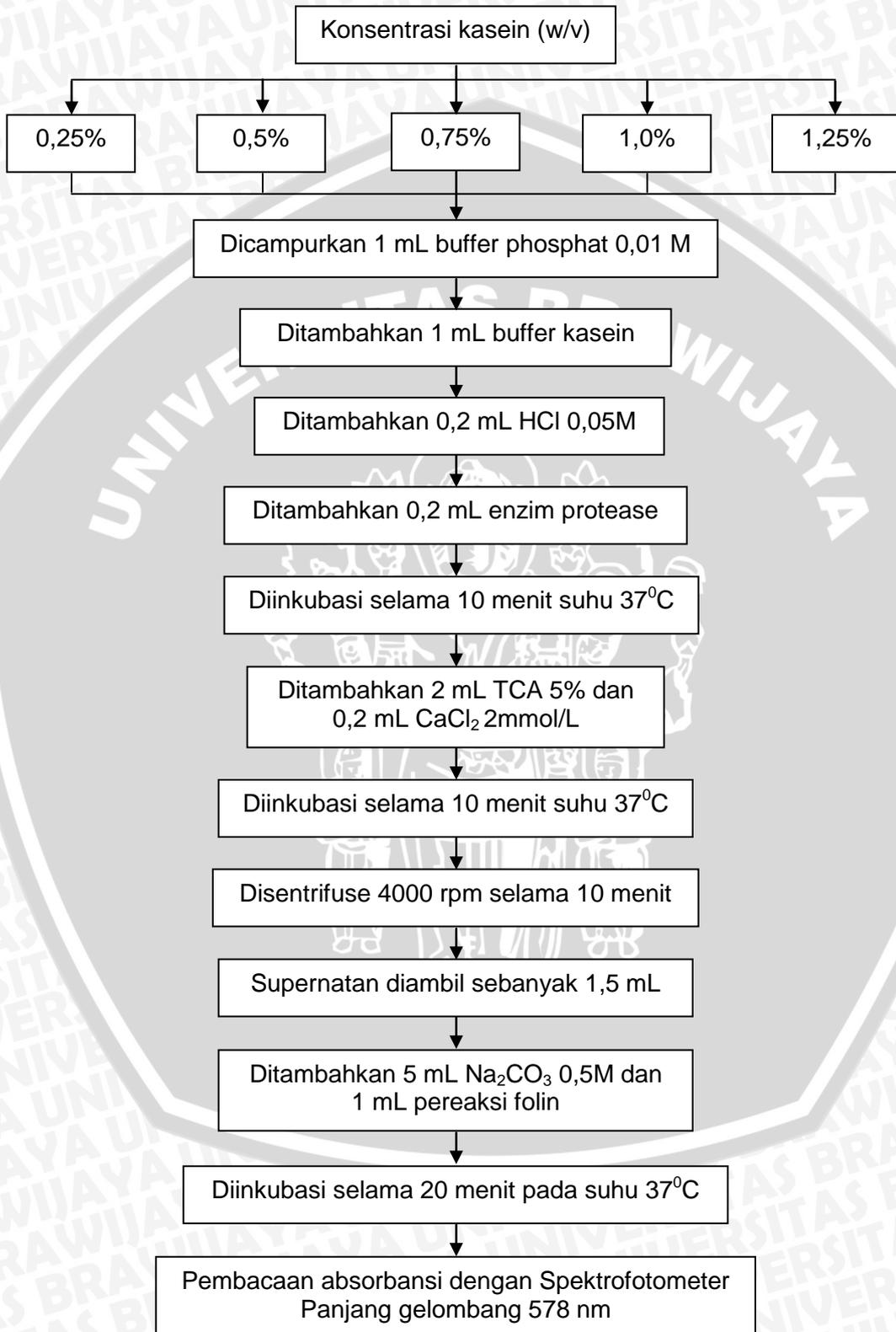
- Dicampurkan 1 mL buffer fosfat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCl 0,05 mol/L dan 0,2 mL aquades
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C

- Ditambahkan 2 mL TCA (Tri Cloro Acid) 5% dan 0,2 mL larutan enzim protease
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C
- Disentrifuse 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatan 1,5 mL
- Dicampur 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

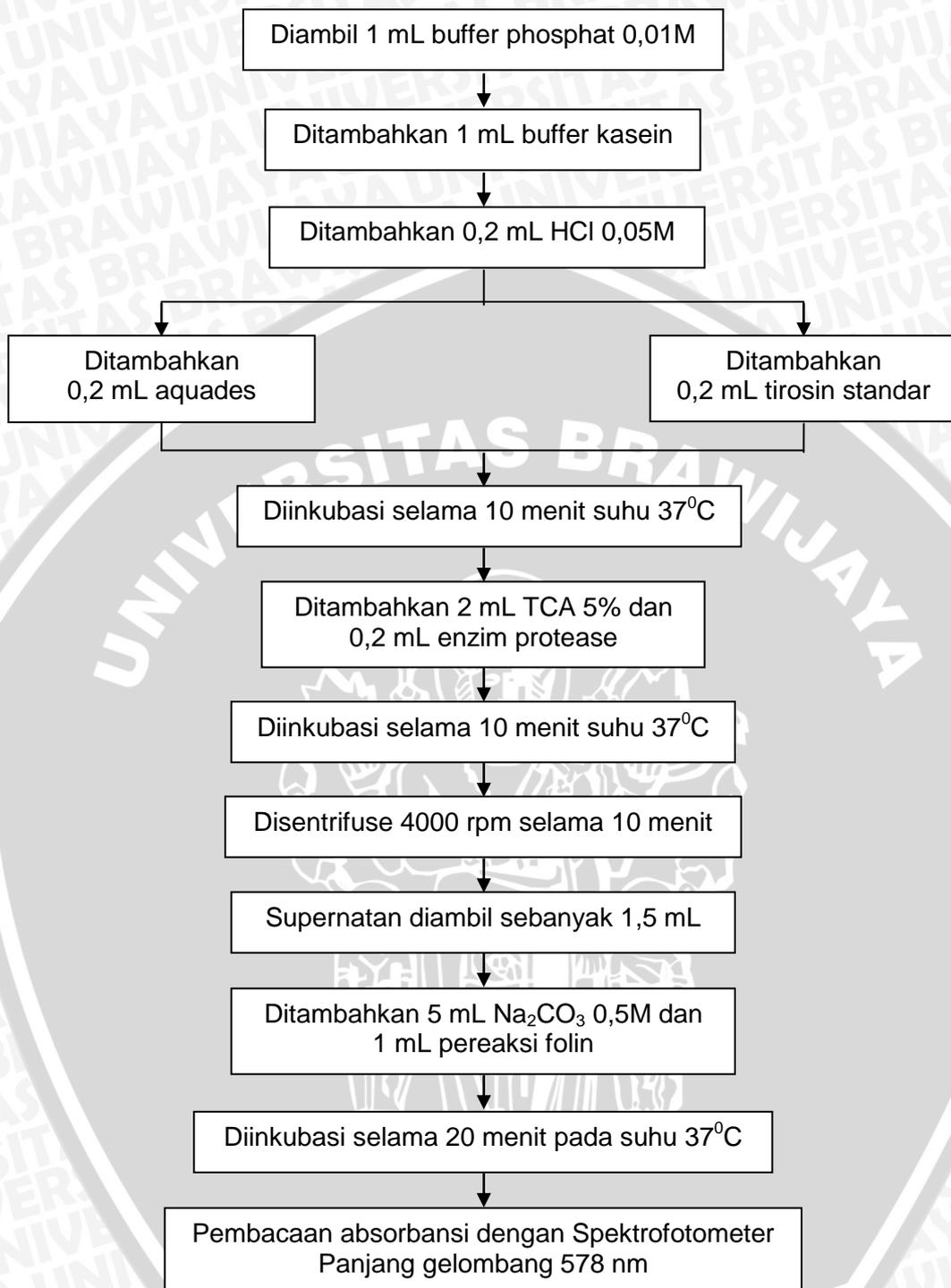


7.2 Skema Penentuan V_{maks} dan K_m

7.2.1 Skema Pembuatan Sampel



7.2.2 Skema pembuatan Blanko dan Larutan Standar



Lampiran 8. Langkah-langkah Analisa Gravimetri

8.1 Langkah-langkah Analisa Gravimetri

- a) Cuplikan ditimbang dan dilarutkan sehingga partikel yang akan diendapkan dijadikan ion-ionnya.
- b) Ditambahkan pereaksi agar terjadi endapan.

Perhatikan:

- Reaksi yang terjadi
 - Keadaan optimum untuk pengendapan
 - Kemurnian endapan
 - Proses terjadinya *kopresipitasi*
 - Terjadinya endapan yang mudah disaring
 - Endapan yang mudah dicuci
- c) Proses pemisahan endapan/penyaringan endapan, macam-macam penyaring, memilih kertas saring yang sesuai, cara-cara mempersiapkan kertas saring pada corong, cara memelihara cairan dalam corong waktu menyaring.
 - d) Mencuci endapan, cairan pencuci, cara mengerjakan pencucian, cara memeriksa kebersihan dan mengeringkan endapan.
 - e) Mengabukan kertas saring dan memijarkan endapan.

Perhatikan Cara:

- Melipat kertas saring yg ada endapannya
 - Mengabukan kertas saring di dalam cawan porselin yang bobotnya konstan
 - Memijarkan endapan sampai beratnya konstan
- f) Menghitung hasil analisa. Faktor kimia (*factor gravimetric*) dapat digunakan.

Perhitungan dalam analisis gravimetri endapan yang dihasilkan ditimbang dan dibandingkan dengan berat sampel. Prosentase berat analit A terhadap sampel dinyatakan dengan persamaan:

$$%A = \frac{\text{Berat } A}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$



Lampiran 9. Analisa *Optical Density* (OD)

9.1 Analisa *Optical Density* (OD)

Penyebab kesalahan sistematik yang sering terjadi dalam analisis menggunakan spektrofotometer adalah:

a) Serapan oleh pelarut

Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan blangko, yaitu larutan yang berisi matrik selain komponen yang akan dianalisis.

b) Serapan oleh kuvet

Kuvet yang biasa digunakan adalah dari bahan *glas* atau *kuarsa*. Dibandingkan dengan kuvet dari bahan gelas, kuvet kuarsa memberikan kualitas yang lebih baik, namun tentu saja harganya jauh lebih mahal. Serapan oleh kuvet ini diatasi dengan penggunaan jenis, ukuran, dan bahan kuvet yang sama untuk tempat blangko dan sampel.

c) Kesalahan fotometrik normal pada pengukuran dengan absorbansi sangat rendah atau sangat tinggi, hal ini dapat diatur dengan pengaturan konsentrasi, sesuai dengan kisaran sensitivitas dari alat yang digunakan. (melalui pengenceran atau pemekatan) Sama seperti pHmeter, untuk mengatasi kesalahan pada pemakaian spektrofotometer UV-Vis maka perlu dilakukan kalibrasi. Kalibrasi dalam spektrofotometer UV-Vis dilakukan.

Setting nilai absorbansi = 0

Setting nilai transmitansi = 100 %

Penentuan kalibrasi dilakukan denganikuti prosedur sebagai berikut:

- Dilakukan dengan larutan blangko (berisi pelarut murni yang digunakan dalam sampel) dengan kuvet yang sama.
- Setiap perubahan panjang gelombang diusahakan dilakukan proses kalibrasi.
- Proses kalibrasi pada pengukuran dalam waktu yang lama untuk satu macam panjang gelombang, dilakukan secara periodik selang waktu per 30

menit. Dengan adanya proses kalibrasi pada spektrofotometer UV-Vis ini maka akan membantu pemakai untuk memperoleh hasil yang akurat dan presisi (Tahir I., 2010).



Lampiran 10. Analisa Perhitungan Langsung

10.1 Langkah-langkah Analisa Perhitungan Langsung

Menggunakan kotak sedang:

- Bersihkan *Petroff-Hauser Counting Chamber* atau *Haemocytometer* dengan alkohol 70% lalu keringkan dengan *tissue*.

- b) Letakkan cover glass di atas alat hitung.
- c) Tambahkan $\pm 50 \mu\text{L}$ suspensi sel mikroba (kira-kira 1 tetes) dengan cara meneteskan pada parit kaca pada alat hitung. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas. Pastikan bahwa ruangan penuh terisi dengan suspensi, ditambah beberapa kelebihan dalam saluran di sampingnya.
- d) Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
- e) Letakkan alat hitung pada meja benda kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40 x10.
- f) Lakukan perhitungan secara kasar apakah diperlukan pengenceran atau tidak. Jika dalam satu kotak sedang terdapat sel-sel yang banyak dan bertumpuk maka perhitungan akan tidak akurat. Jika demikian, maka diperlukan pengenceran.
- g) Hitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rata-rata dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/mL dikalikan faktor pengenceran.

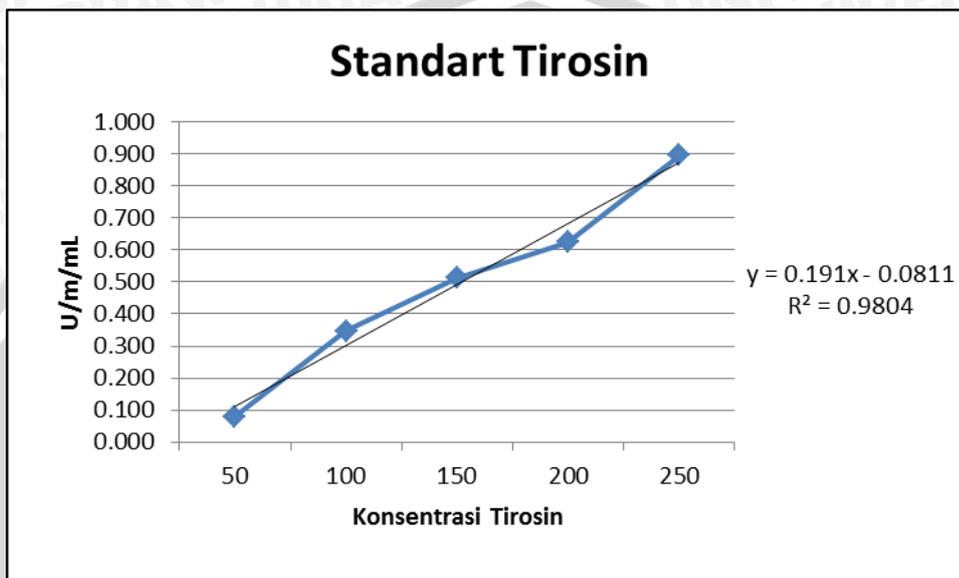
Lampiran 11. Perhitungan V_{maks} dan K_m

Hasil spektrofotometri enzim protease *Bacillus pumilus*

Pengenceran	Ulangan ke-		Rerata
	1	2	
0.25%	0,489	0,503	0,496
0.50%	0,542	0,580	0,561

0.75%	0,646	0,689	0,668
1.00%	0,702	0,793	0,748
1.25%	0,862	0,950	0,906

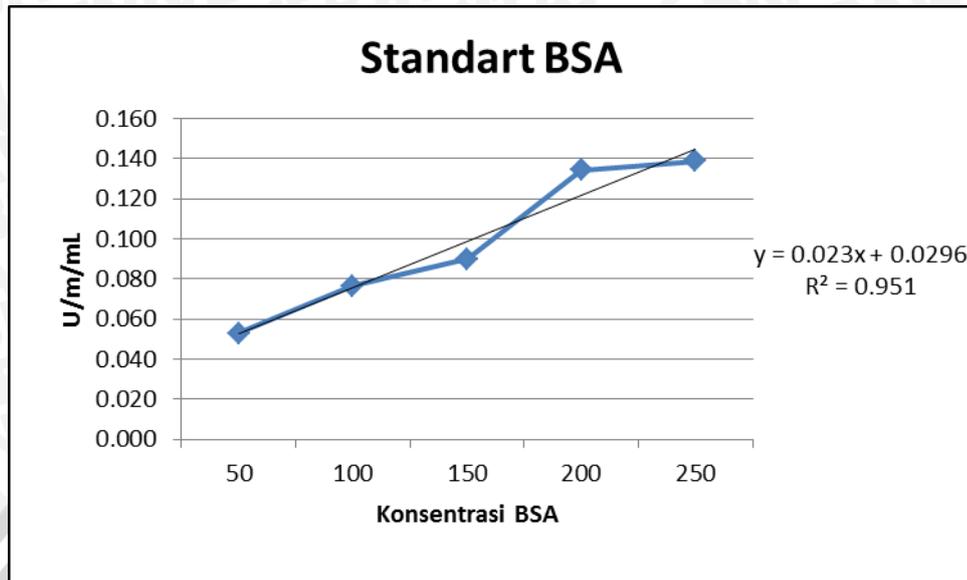
Untuk mendapatkan nilai 1/V digunakan persamaan kurva tirosin



Dari persamaan $y = 0,191x - 0,081$ diperoleh:

Konsentrasi (%)	Ppm (mg/mL)	Pengenceran 100x	V ($\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{L}$)	1/V ($\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{L}$)
0.25%	3,021	302,094	$1,667 \times 10^{-7}$	5997,797
0.50%	3,361	336,126	$1,855 \times 10^{-7}$	5390,544
0.75%	3,921	392,147	$2,164 \times 10^{-7}$	4620,466
1.00%	4,340	434,031	$2,395 \times 10^{-7}$	4174,583
1.25%	5,168	516,754	$2,852 \times 10^{-7}$	3506,311

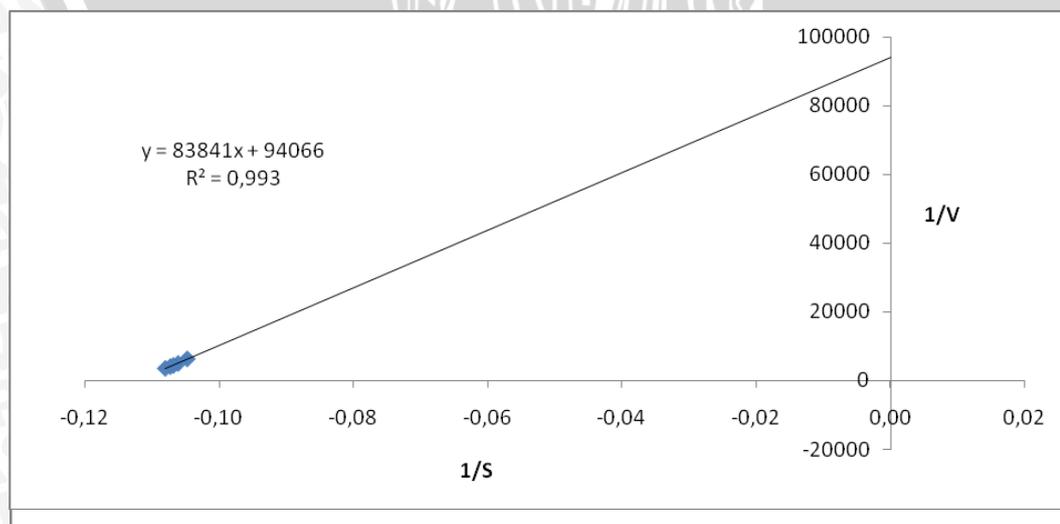
Untuk mendapatkan 1/S digunakan kurva BSA:



Dari persamaan $y = 0,023x + 0,029$ diperoleh:

Konsentrasi (%)	Ppm (mg/mL)	Pengenceran 100x	S (M)	1/S (M)
0.25%	20,304	2030,435	$3,031 \times 10^{-10}$	-0,105
0.50%	23,130	2313,043	$3,452 \times 10^{-10}$	-0,106
0.75%	27,783	2778,261	$4,147 \times 10^{-10}$	-0,107
1.00%	31,261	3126,087	$4,666 \times 10^{-10}$	-0,107
1.25%	38,130	3813,043	$5,691 \times 10^{-10}$	-0,108

Dari hasil 1/V dan 1/S diatas maka dibuat grafik untuk mengetahui V_{maks} dan K_m



Berdasarkan persamaan yang diperoleh $y = 80180x + 90157$, maka:

Untuk mencari $-1/K_m$ $y = 0$

$$0 = 80180x + 90157$$

$$80180x = -90157$$

$$x = -1,1244325$$

$$-1/K_m = -1,1244325$$

$$K_m = 0,8893375 \text{ M}$$

$$= 0,8893375 \times 10^3 \text{ mM}$$

$$= 889,3375 \text{ mM}$$

Untuk mencari V_{maks} $x = 0$

$$1/V_{\text{maks}} = 90157$$

$$V_{\text{maks}} = 0,0000110918 \text{ M L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$= 0,0110918 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$



Lampiran 12. Perhitungan Penentuan Suhu Optimum

Suhu	Ulangan ke-		Total	Rerata	Aktivitas Protease
	1	2			
20°C	0,098	0,100	0,198	0,099	0,685
40°C	0,135	1,123	1,258	0,129	1,241
60°C	0,082	0,093	0,175	0,088	0,472
80°C	0,067	0,075	0,142	0,071	0,167

Perhitungan Penentuan Suhu Optimum:

$$U = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times \frac{1}{T} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

Keterangan:

- U : Unit aktifitas per menit per mL enzim
Asp : Nilai absorbansi sampel
Ast : Nilai absorbansi standart (0,089)
Abl : Nilai absorbansi blanko (0,062)
T : Waktu Inkubasi (menit) (10)

▪ Suhu 20°C

$$U = \frac{0,099 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 0,685 \text{ U/m/mL}$$

▪ Suhu 40°C

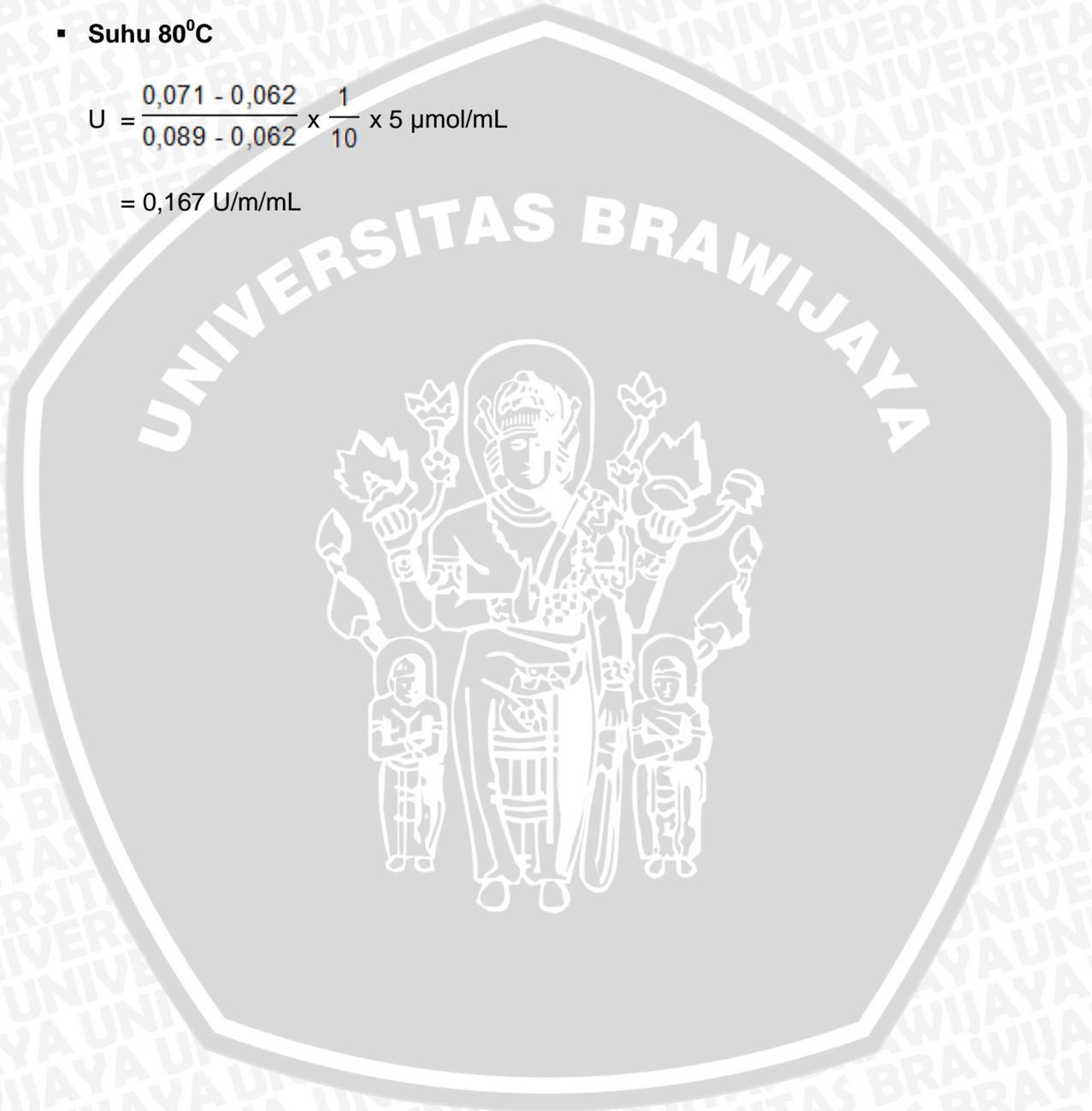
$$U = \frac{0,129 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,241 \text{ U/m/mL}$$

- Suhu 60°C

$$U = \frac{0,088 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,472 \text{ U/m/mL}$$

- Suhu 80°C

$$U = \frac{0,071 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 0,167 \text{ U/m/mL}$$



Lampiran 13. Perhitungan Penentuan pH Optimum

pH	Ulangan ke-		Total	Rerata	Aktivitas Protease
	1	2			
5	0,154	0,161	0,315	0,1575	1,769
6	0,272	0,235	0,507	0,2535	3,546
7	1,174	0,160	0,334	0,1670	1,944
8	0,162	0,147	0,309	0,1545	1,713
9	0,117	0,154	0,271	0,1355	1,361

Perhitungan Penentuan pH Optimum:

$$U = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times \frac{1}{T} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

Keterangan:

- U : Unit aktifitas per menit per mL enzim
- Asp : Nilai absorbansi sampel
- Ast : Nilai absorbansi standart
- Abl : Nilai absorbansi blanko
- T : Waktu Inkubasi (menit)

▪ pH 5

$$U = \frac{0,1575 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,769 \text{ U/m/mL}$$

▪ pH 6

$$U = \frac{0,2535 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 3,546 \text{ U/m/mL}$$

- pH 7

$$U = \frac{0,1670 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,944 \text{ U/m/mL}$$

- pH 8

$$U = \frac{0,1545 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,713 \text{ U/m/mL}$$

- pH 9

$$U = \frac{0,1355 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,361 \text{ U/m/mL}$$



Lampiran 14. Perhitungan Penentuan Waktu Inkubasi

Waktu	Ulangan ke-		Total	Rerata	Aktivitas Protease
	1	2			
4	0,299	0,315	0,614	0,011	4,537
8	0,365	0,337	0,702	0,020	5,352
12	0,418	0,378	0,796	0,028	6,222
16	0,379	0,346	0,725	0,023	5,565

Perhitungan Penentuan Waktu Inkubasi:

$$U = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times \frac{1}{T} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

Keterangan:

- U : Unit aktifitas per menit per mL enzim
- Asp : Nilai absorbansi sampel
- Ast : Nilai absorbansi standart
- Abl : Nilai absorbansi blanko
- T : Waktu Inkubasi (menit)

▪ Waktu Inkubasi 4 jam

$$U = \frac{0,307 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 4,537 \text{U/m/mL}$$

▪ Waktu Inkubasi 8 jam

$$U = \frac{0,351 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 5,352 \text{U/m/mL}$$

- Waktu Inkubasi 12 jam

$$U = \frac{0,398 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 6,222 \text{ U/m/mL}$$

- Waktu Inkubasi 16 jam

$$U = \frac{0,363 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 5,565 \text{ U/m/mL}$$

