

**AKTIVITAS ENZIM PROTEASE KASAR *Bacillus mycoides*
DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN PADA
PERUBAHAN pH DAN WAKTU INKUBASI**

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

Oleh:

BERLIAN CAHYA PRIMAYUDHA

NIM.0610830025



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2012

**AKTIVITAS ENZIM PROTEASE KASAR *Bacillus mycoides*
DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN PADA
PERUBAHAN pH DAN WAKTU INKUBASI**

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

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

**Oleh:
BERLIAN CAHYA PRIMAYUDHA
NIM. 0610830025**



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

LAPORAN SKRIPSI

AKTIVITAS ENZIM PROTEASE KASAR *Bacillus mycoides*
DARI IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN PADA
PERUBAHAN pH DAN WAKTU INKUBASI

Oleh:

BERLIAN CAHYA PRIMAYUDHA

NIM. 0610830025

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. HARTATI K., MS)

NIP. 19640726 198903 2 004

Tanggal:

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Ir. DARIUS, M. Biotech)

NIP. 19500531 198103 1 003

Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

RINGKASAN

BERLIAN CAHYA PRIMAYUDHA. Skripsi Aktivitas enzim protease kasar *Bacillus mycoides* dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin terhadap perubahan pH dan waktu inkubasi (di bawah bimbingan **Ir. DARIUS, M. Biotech** dan **Dr. Ir. HARTATI KARTIKANINGSIH, MS**)

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

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

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian perlakuan pH yang berbeda (5, 6, 7, 8, 9) dikelompokkan berdasarkan lama inkubasi yang berbeda (6, 12, 18, 24 jam) untuk mengetahui aktivitas optimum enzim protease. Masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali ulangan, sehingga terdapat 40 unit percobaan. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian

Berdasarkan uji statistik dengan menggunakan RAL, bahwa perlakuan pH yang berbeda memberikan pengaruh beda nyata terhadap aktivitas protease. Perlakuan waktu inkubasi yang berbeda memberikan pengaruh yang tidak beda nyata terhadap aktivitas protease. pH memberikan pengaruh terhadap aktivitas protease, dimana perubahan pH dapat menyebabkan denaturasi enzim sehingga dapat menimbulkan hilangnya fungsi katalitik enzim. Waktu inkubasi tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas protease, dimana produksi enzim sejajar dengan kurva pertumbuhan dan mencapai optimal pada akhir fase eksponensial.

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa perlakuan terbaik pH yang berbeda adalah pada pH 5 dengan rata-rata aktivitas protease sebesar 5,243 $\mu\text{g/ml/menit}$ dan pada jam ke-24 sebesar 5,154 $\mu\text{g/ml/menit}$. Perubahan pH mempengaruhi aktivitas enzim karena dapat menyebabkan terjadinya pada daerah katalik dan koformasi dari enzim, dimana sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim tersebut.

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

KATA PENGANTAR

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

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

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

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

Malang, Juni 2012

Penulis

Persembahan Skripsi Untuk

- © Ayah dan ibu ku tercinta yang tidak henti memberikan motivasi dan doa-doa nya demi lancarnya penyusunan tugas putranya.
- © Adik- adikku tersayang yang juga memberikan dukungan kepada kakaknya, semoga kakak bisa menjadi contoh terhadap kalian.
- © Jemen-temen JHP 06 baik yang sudah lulus maupun yang belum terima kasih memberi support yang sangat luar biasa sekali di saat sang penulis sudah mengalami kegalauan tingkat tinggi dalam mengerjakan tugas ini. *KALIAN YANG TERBAIK*
- © Team Bacillus Vs Angry birds yang selalu bersemangat dalam mengerjakan tugas ini walaupun banyak rintangan dan hadangan tetapi masih tetap fighting. Thank's all
- © All my Partners in Crime terima kasih telah mengisi hari- hariku selama ini, susah tidak selalu senang bersama..aku pasti akan merindukan kalian semua.
- © Keluarga Besar KK 12, you are my family in Malang. I miss you all (Gigih Jefri, Pisthon Sheila, Widjayanto Dwiantoro, Denis Saputra and Zul Bahari serta Bapak Firman sekeluarga)
- © Terakhir special performance from Mbah Anus Shabur yang tak hentinya memberikan semangat sehingga mendapat banyak pengalaman ngelab yang sangat luar biasa.

Presented by Famous Stars n Straps

DAFTAR ISI

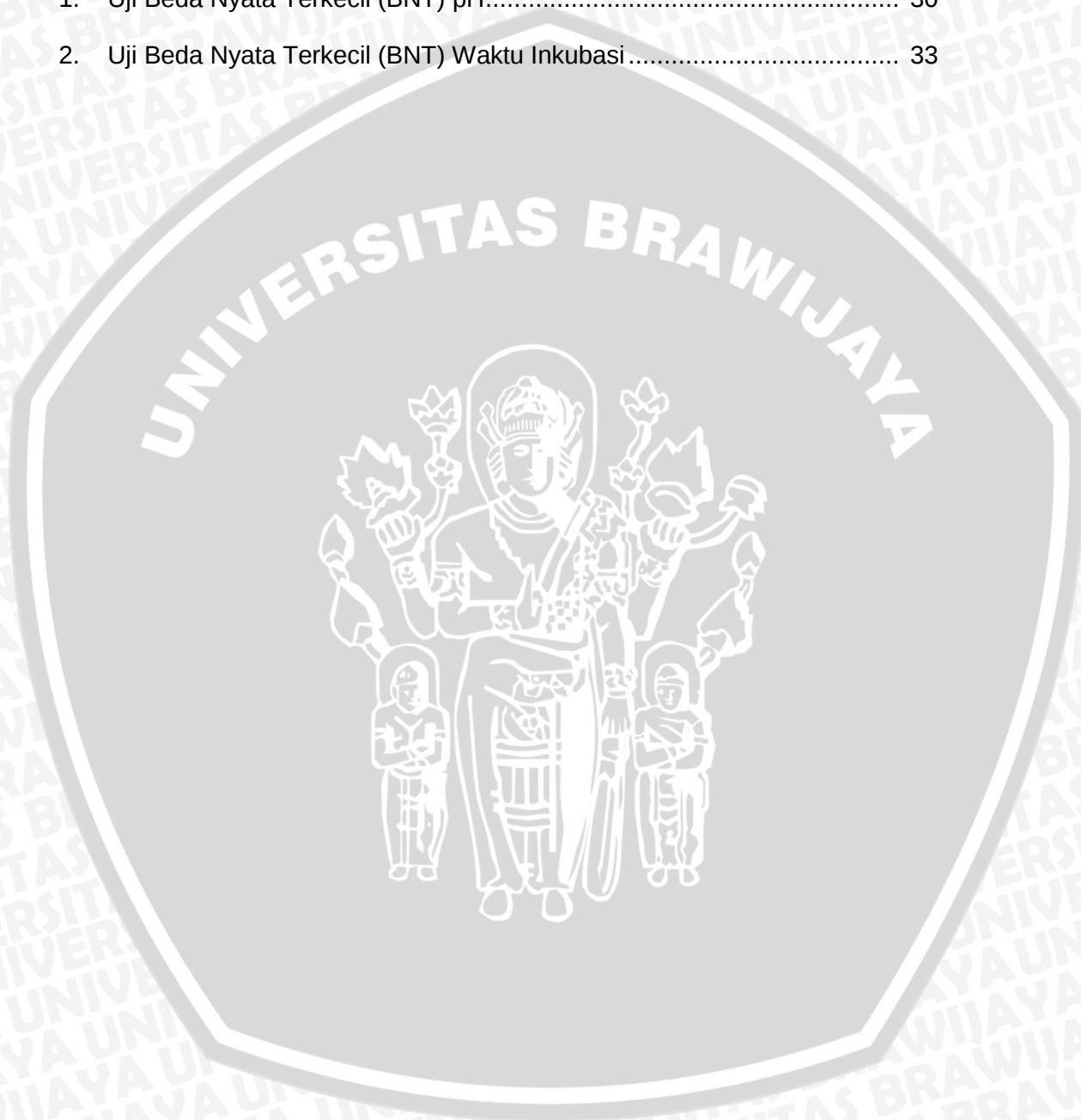
	Halaman
RINGKASAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Kegunaan Penelitian.....	4
1.5 Hipotesis.....	5
1.6 Tempat dan Waktu.....	5
 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Teri.....	6
2.2 <i>Bacillus mycoides</i>	7
2.3 Bakteri Proteolitik.....	8
2.4 Enzim Protease.....	9
2.5 Isolasi Bakteri Proteolitik.....	11
2.6 Karakterisasi Bakteri Proteolitik.....	12
2.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri	13
2.7.1 Analisa Gravimetri	16
2.7.2 Analisa <i>Optical Density</i>	17

2.8	Pengujian Aktivitas Protease.....	18
3. METODE PENELITIAN		
3.1	Materi Penelitian	21
3.1.1	Bahan Penelitian.....	21
3.1.2	Alat Penelitian	21
3.2	Metode dan Rancangan Percobaan.....	22
3.2.1	Metode Penelitian	22
3.2.2	Rancangan Percobaan	23
3.2.3	Analisis Data.....	24
3.3	Prosedur Penelitian.....	24
3.3.1	Pembuatan Kultur Stok Isolat	24
3.3.2	Inokulasi Bakteri <i>B. mycoides</i> pada media LB Agar	25
3.3.3	Produksi Crude Enzim	25
3.3.4	Pengujian Aktivitas Protease	26
3.3.4.1	Cara Penentuan Aktivitas Protease.....	27
3.3.4.2	Kurva Standard Tirosin	27
4. HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Hasil Analisis Aktivitas Protease Pada Perlakuan pH.....	30
4.2	Hasil Analisis Aktivitas Protease Pada Perlakuan Waktu Inkubasi ..	32
5. PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	36
5.2	Saran	36
DAFTAR PUSTAKA.....		37
LAMPIRAN.....		40

DAFTAR TABEL

Tabel

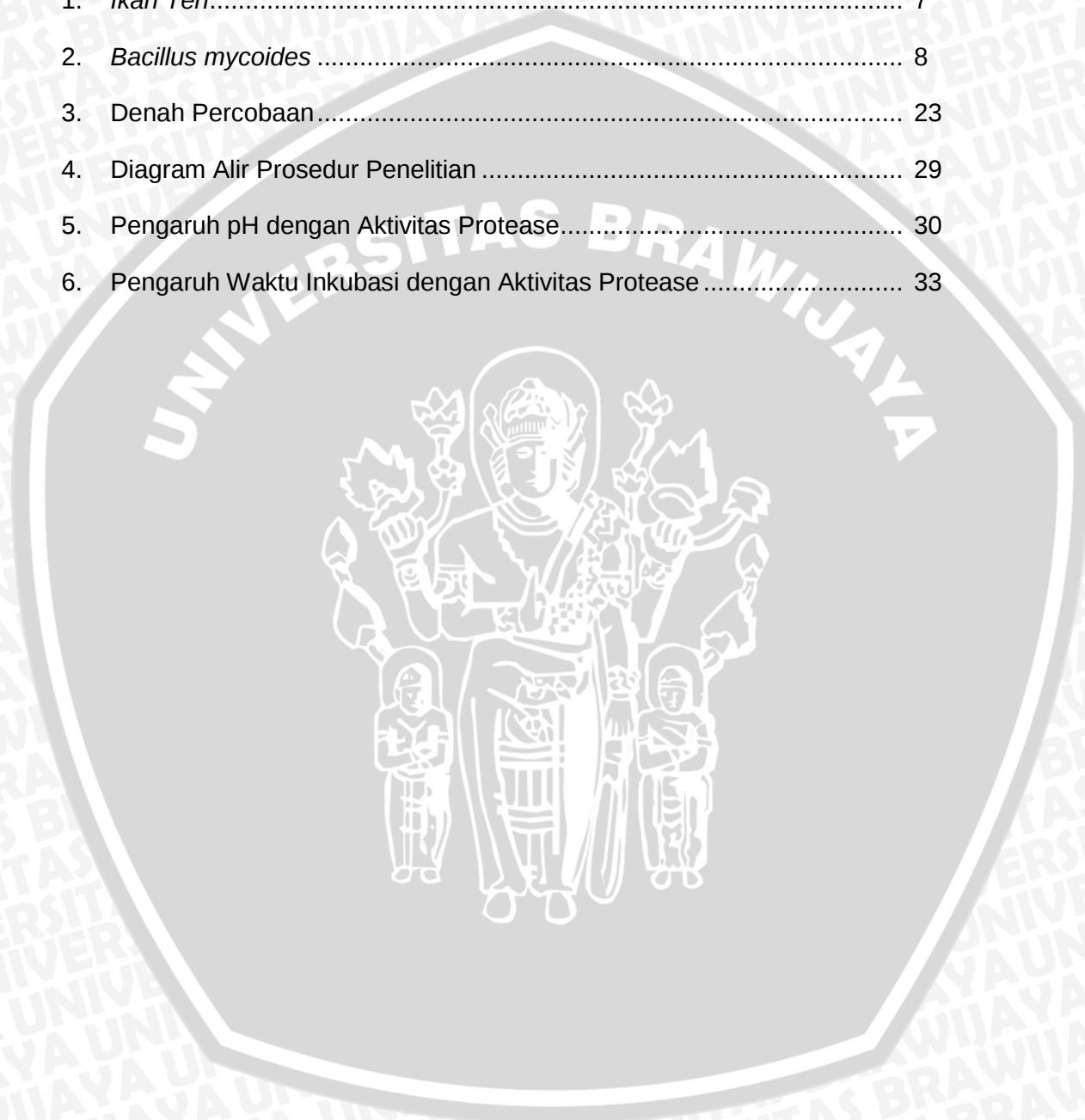
1. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pH..... 30
2. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Waktu Inkubasi..... 33



DAFTAR GAMBAR

Gambar

1. Ikan Teri.....	7
2. <i>Bacillus mycoides</i>	8
3. Denah Percobaan.....	23
4. Diagram Alir Prosedur Penelitian	29
5. Pengaruh pH dengan Aktivitas Protease.....	30
6. Pengaruh Waktu Inkubasi dengan Aktivitas Protease	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Pembuatan Kultur Stok Isolat.....	40
2. Inokulasi Bakteri <i>B. mycoides</i> Pada Media LB (<i>Luria Bertani Agar</i>).	41
3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan.	42
4. Produksi Crude Enzim	44
5. Analisis Aktivitas Protease.....	46
6. Pembuatan Larutan	48
7. Data Penelitian	51
8. Data Analisa Protease	59



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan potensi sumber daya ikan di laut cukup besar. Salah satu potensi perikanan laut tersebut adalah ikan teri karena mempunyai arti penting sebagai bahan makanan yang dimanfaatkan sebagai ikan segar maupun ikan kering. Ikan teri (*Stolephorus spp.*) adalah ikan yang termasuk ke dalam kelompok ikan pelagis kecil, yang diduga merupakan salah satu sumberdaya perikanan paling melimpah diperairan Indonesia. (Csirke, 1988).

Ikan teri merupakan ikan yang mudah rusak (pembusukan) bila dibiarkan cukup lama. Oleh karena itu, harus segera diolah salah satunya melalui pengawetan dengan cara pengasinan. Tujuan utama proses pengolahan dan pengawetan ikan adalah untuk memperpanjang daya tahan dan daya simpan ikan sehingga ikan dapat awet karena garam dapat menyerap cairan tubuh ikan yang merupakan media pertumbuhan bakteri sehingga mengakibatkan aktivitas bakteri tersebut terganggu dan menghambat atau membunuh bakteri penyebab kerusakan pada ikan. Salah satunya dengan cara pengasinan.

Menurut Resmiati, *et. al.*, (2003), pengasinan adalah suatu proses pengolahan ikan teri dengan cara memberikan garam sehingga mempunyai kandungan garam sangat tinggi (NaCl yang jenuh pada fase masih mengandung air) yang kemudian dikeringkan. Cara pengolahan tersebut telah lama dilakukan untuk beraneka ragam species ikan.. Salah satu species ikan sering dibuat menjadi ikan asin adalah ikan teri. Ikan teri asin merupakan salah satu jenis makanan yang diolah dan diawetkan dengan menggunakan konsentrasi garam yang relatif tinggi sehingga optimal untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

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, 2003). 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 (Kushner, 1989).

Pada ikan teri asin yang memiliki kandungan protein tinggi maka berdasarkan pengelompokan karakterisasi bakteri berdasarkan sifat pertumbuhannya pada makanan merupakan bakteri proteolitik. Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar sel. Semua bakteri mempunyai enzim proteinase di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim proteinase ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat dibedakan atas beberapa kelompok yaitu: bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang tidak membentuk spora misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*, bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif yang membentuk spora misalnya *Bacillus*, dan bakteri anaerobik pembentuk spora misalnya sebagian *Clostridium* (Fardiaz, 1992). Aktivitas enzim proteolitik *Bacillus mycoides* dari ikan teri asin yang termasuk bakteri halofilik dalam makanan yang diasinkan merupakan indikator pencemar yang menandakan terjadinya pembusukan yang terjadi karena adanya aktivitas enzimatik seperti amilase dan protease yang mendegradasi bahan makanan yang diasinkan (Ventosa and Oren, 1995).

Pada macam-macam media dapat menghasilkan banyak jenis bakteri, hal ini telah dilaporkan oleh beberapa peneliti antara lain: Menurut Misfit Putrina dan Fardedi (2005), dalam penelitiannya menyebutkan bahwa air rendaman kedelai yang merupakan limbah tahu dan air kelapa dapat dijadikan sebagai media

perbanyak bakteri *Bacillus thuringiensis* yang merupakan bakteri entomopatogen *Spodoptera litura* karena media tersebut dinilai lebih murah dan mudah untuk didapatkan daripada Nutrien Broth yang mahal meskipun dalam perkembangannya Bt lebih cepat tumbuh di Nutrien Broth. Namun penelitian tentang kemampuan bakteri proteolitik yang tumbuh di dalam media garam dan seberapa besar karakter enzim proteolitik yang dapat tumbuh pada media tersebut masih belum diketahui di Indonesia.

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bacillus mycoides* karena bakteri ini merupakan bakteri yang sering terdapat pada produk-produk hasil perikanan. Dimana bakteri tersebut didapatkan dari penelitian sebelumnya tentang Isolasi Bakteri Proteolitik dari Ikan Teri Asin yang dilakukan oleh Apsari (2011), yang didapatkan 4 bakteri yaitu *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, dan *Bacillus firmus*. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas enzim protease *Bacillus mycoides* yang diisolasi dari ikan teri asin dengan perlakuan pH dan waktu inkubasi yang berbeda untuk mendapatkan pH optimum.

1.2 Rumusan Masalah

Bacillus mycoides merupakan mikroba yang dapat memproduksi enzim, karena mikroba jenis *Bacillus* ini tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstrasel membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri. Susanti (2003), menyebutkan bakteri ini merupakan bakteri halofilik yang dapat tumbuh dilingkungan berkadar garam tinggi dan kebutuhan nutrisinya yang sederhana

membuatnya memiliki potensi yang tinggi untuk dimanfaatkan di dalam bidang industri enzim.

Penelitian yang dilakukan oleh Prabowo (2010), mengenai karakteristik bakteri proteolitik yang diisolasi dari ikan selar kuning asin diperoleh bakteri dapat tumbuh pada suhu 60°C, pH 4 dan a_w 0,75 dengan morfologi koloni berbentuk bulat, tetapi tidak rata, evaluasi cembung berwarna putih dan merupakan gram positif. Penelitian tentang karakteristik aktivitas enzim dari bakteri yang tumbuh pada isolasi ikan teri asin masih belum banyak dilakukan di Indonesia mengingat potensi yang besar dari bakteri *Bacillus mycoides*. Dari uraian tersebut maka didapatkan permasalahan bagaimanakah aktivitas enzim protease *Bacillus mycoides* dengan perlakuan pH optimum dan waktu inkubasi.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mendapatkan aktivitas enzim protease *Bacillus mycoides* yang diisolasi dari ikan teri asin pada perlakuan pH dan waktu inkubasi

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat :

1. Sebagai informasi kepada masyarakat tentang uji aktivitas enzim protease meliputi penentuan pH optimum dan waktu inkubasi.
2. Sebagai sumber informasi bagi penelitian selanjutnya.

1.5 Hipotesis

Terdapat pengaruh antara perlakuan pH dan waktu inkubasi terhadap aktivitas protease. Interaksi antara pH dan waktu inkubasi tidak berpengaruh terhadap aktivitas protease.

1.6 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari 2012.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Teri

Menurut Mulyani (2004), ikan teri (*Stolephorus* spp) terdapat di seluruh perairan pantai Indonesia dengan nama yang berbeda-beda seperti: Teri (Jawa, Jawa Barat/ Jakarta), Bilis (Jawa Barat/ Jakarta), eha (Seram), ake-ake (Ambon), puri (Saparua), badar (Padang) dan lure (Sulawesi). Teri termasuk dalam keluarga ikan bertulang keras dengan klasifikasi dan gambar Ikan Teri (*Stolephorus* spp) dapat dilihat pada gambar 1 di bawah ini. :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Kelas	: Pisces
Sub kelas	: Teleostei
Ordo	: Malacopterygii
Family	: Clupeidae
Sub family	: Engraulidae
Genus	: <i>Stolephorus</i>
Spesies	: <i>Stolephorus</i> spp



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

Ikan teri adalah salah satu jenis ikan yang paling populer di kalangan penduduk Indonesia. Ikan ini umumnya berukuran kecil sekitar 6 – 9 cm, misalnya *Stolephorus commersoni* dan *S. indicus*. Selanjutnya dikatakan bahwa

ikan teri bersifat pelagic dan penghuni perairan pesisir dan eustuaria, tetapi beberapa jenis dapat hidup pada salinitas rendah antara 10-15 permil, hidup bergelombol (Hutomo, et al.,1987).

2.2 *Bacillus mycoides*

Bacillus mycoides merupakan bakteri berbentuk rantai, motil, dan dapat membentuk asam dari glukosa. Sel tubuhnya memiliki ukuran sepanjang 3 μm . Uji identifikasi dengan menggunakan metode Vosges-Prostkauer, *Bacillus mycoides* menghasilkan enzim yang mereduksi nitrat dan methylen blue. *Bacillus mycoides* adalah bakteri yang memproduksi endospora dalam siklus hidupnya. Endospora merupakan bentuk dorman dari sel vegetatif, sehingga metabolismenya bersifat inaktif dan mampu bertahan dalam tekanan fisik dan kimia seperti panas, kering, dingin, radiasi dan bahan kimia (Itis, 2008). Klasifikasi bakteri *Bacillus mycoides* menurut Holt (2000), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bakteri
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Order	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus mycoides</i>

Species *Bacillus* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *Bacillus cerus* dan *Bacillus anthracis*. Mikroba jenis *Bacillus* 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. Saat ini

Bacillus mycoides dipakai sebagai organisme inang untuk studi DNA (Doi, et al., 1992).



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

2.3 Bakteri Proteolitik

Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar 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). 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).

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* (Marcy dan Pruett dalam Downes dan Ito, 2001). Enzim ekstraseluler banyak digunakan dalam industri, karena dihasilkan dalam jumlah besar dan metode ekstraksi cukup mudah (Stanbury dan Whitaker, 1984 dalam Fatimah, 2005).

2.4 Enzim Protease

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 Peranginangin (1996) dalam 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 Volk dan Wheeler (1984) dalam 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.

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).

Menurut Rao, *et al.*, (1998) dalam Fatimah (2005), protease merupakan enzim pengurai yang mengkatalisis hidrolisis total protein. Protease terdiri atas empat subkelompok berdasarkan mekanisme katalitik enzim, yaitu: protease serin, protease sistein, protease asam, dan protease logam atau metaloprotease. Enzim ini dapat dihasilkan secara intraseluler dan ekstraseluler oleh tanaman, hewan, dan mikrob, serta mempunyai peranan penting dalam metabolisme dan regulasi dalam sel (Ward 1983 dalam Fatimah, 2005). 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 (Stanbury dan Whitaker, 1984 dalam Fatimah, 2005).

2.5 Isolasi Bakteri Proteolitik

Isolasi bakteri proteolitik dapat dilakukan menggunakan media *skim milk agar* (SMA). Kasein terhidrolisa dalam *skim milk agar* yang keruh digunakan

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

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

Isolasi dan seleksi dilakukan berdasarkan metode yang dipakai Durham *et al.*, (1987). Seluruh media yang digunakan memiliki pH 10,2. Inkubasi dilakukan pada suhu 50°C. Isolat yang telah murni disimpan dalam medium penyimpanan

pada suhu 4°C, selanjutnya secara serentak *ditotal* ulang pada medium agar susu skim untuk diukur diameter koloni dan zona jernihnya. Nisbah antara diameter zona jernih terhadap diameter koloni (indeks proteolitik = IP). Isolat dengan IP $\geq 3,0$ dipilih dan disimpan pada suhu 4°C.

2.6 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. Di antara suhu maksimum, ke atas yang mana kultur akan tidak berkembang, dan suhu minimum, ke bawah yang mana kultur akan tidak berkembang, adalah jarak di mana pertumbuhan akan tampak. Pertumbuhan terbaik agak berada dalam jarak terbatas yang disebut suhu optimum. Suhu optimum bagi pertumbuhan spesies mikroba adalah hubungan terbaik dengan suhu habitat asli organisme (Seeley dan Vandemark, 1962).

Salah satu bentuk dari media selektif adalah yang mana pH medianya telah dimodifikasi sehingga sesuai hanya untuk pertumbuhan spesies toleran

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

2.7 Kurva Pertumbuhan

Sel hidup berisi senyawa polimer dengan bobot molekul tinggi seperti protein, asam nukleat, polisakarida, lipida, lemak dan lainnya. Biopolimer ini membentuk struktur elemen dalam gel hidup, misalnya dinding sel berisi polisakarida, protein, lipida, sitoplasma gel berisi protein terutama dalam bentuk enzim. Selain itu juga berisi metabolit dalam bentuk garam anorganik seperti NH_4^+ , PO_4^{3-} , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , SO_4^{2-} dan metabolit antara seperti piruvat, asetat, vitamin. Komposisi elemen yang dibutuhkan pada sel bakteri kira-kira 50% C, 20% O, 14% N, 3% P, 1% S dan sejumlah kecil K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , vitamin. Elemen-elemen ini diperoleh dari bahan makan yang tersedia (Salmah, 2004).

Pertumbuhan adalah penambahan secara teratur semua komponen sel suatu jasad. Pembelahan sel adalah hasil dari pembelahan sel. Pada jasad bersel tunggal (uniseluler), pembelahan atau perbanyakan sel merupakan pertambahan jumlah individu. Misalnya pembelahan sel pada bakteri akan menghasilkan pertambahan jumlah sel bakteri itu sendiri. Pada jasad bersel banyak (multiseluler), pembelahan sel tidak menghasilkan pertambahan jumlah

individu, 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 (Sumarsih, 2003).

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 tersu inilah yang dihitung dengan berbagai metode untuk menetapkan jumlah sel hidup. Kultur mikroorganisme pada lingkungan yang baru melakukan pengenalan terhadap komponen makromolekul dan mikromolekul termasuk kegiatan untuk mendapatkan pengetahuan akan sintesis atau represi enzim-enzim tertentu (Said, 1986). Pada jumlah total sel ikut dihitung semua sel yang nampak atau yang dapat dihitung dengan cara lain, sehingga dengan demikian sel-sel mati dan cacat ikut dihitung (Volk dan Wheeler, 1993).

Pertumbuhan mikrobial 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 (*viable*) dalam media akibat terjadinya kematian (*mortalitas*) (Mangunwidjaja, *et al.*, 1994).

2.7.1 Analisa Gravimetri

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

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

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

2.7.2 Analisa Optical Dencity

Analisa optical dencity ini menggunakan metode spektrofotometer. Salah satu contoh instrumentasi analisis yang lebih kompleks adalah spektrofotometer. Gambar spektrofotometer dapat dilihat pada Lampiran 13.

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

2.8 Pengujian Aktivitas Protease

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan variasi suhu optimum. Variasi suhu dilakukan saat inkubasi kasein oleh enzim protease dimana enzim yang digunakan merupakan ekstrak liofilisasi. Variasi yang digunakan adalah 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, dan 50°C, aktivitas ekstrak kasar enzim ini diuji dengan menggunakan metode Nakanashi (1974). Metode ini menggunakan casein sebagai substrat (Kosim dan Putra, 2010).

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. 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 enzimatis dipengaruhi pH, sehingga diperlukan buffer 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).

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

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

Pengukuran aktivitas protease ini menggunakan metode Bregmeyer dan Grasal (1983). Prinsip kerja dari metode ini yaitu kasein yang berfungsi sebagai substrat akan dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi 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 (Sumarlin, 2010).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas enzim protease ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu Media:; Bakteri *Bacillus mycoides*, media LB (*Luria Bertani*) yang terdiri dari peptone, *extract yeast*, NaCl dan Agar, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ reagent TCA, L-Tirosin, HCl, Reagent folin, Aquades, kertas saring Whatman no. 42, Tris (Hidroksi metil) amino methane, kertas label, sarung tangan, aluminium foil, tissue, tali, alkohol 90%, spirtus, buffer fosfat.

Untuk bahan-bahan yang berupa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ merupakan pereaksi analisis didapatkan dari panadia *Laboratory*, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang sedangkan reagent TCA, L-Tirosin, HCl, Reagent folin merupakan pereaksi analisis CV Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha. Untuk Tris (Hidroksi metil) amino methane dan L tirosin yang merupakan pereaksi analisis didapatkan dari laboratorium Biokimia fakultas MIPA jurusan kimia Universitas Brawijaya Malang.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam karakterisasi bakteri proteolitik ini terdiri dari tabung reaksi merk Pyrex, rak tabung reaksi, cawan petri merk Pyrex, pipet volume 10 ml merk Pyrex, bola hisap, pipet serologis merk Pyrex, erlenmeyer 50 ml merk Duran, gelas ukur 25 ml, 50 dan 100 ml, beaker glass 50, 100, 200 dan 500 ml merk Pyrex, spatula, *micropipet* merk Avi-Teck, *microtube* merk Iwaki, autoklaf, timbangan digital merk Mettler Toledo dengan ketelitian 0,01 gr, nampan, *shaker incubator* SI-600R, inkubator merk Memmert, *vortex mixer* merk Barnstead, jarum loop, jarum ose, *sprayer*, serbet, panci, bunsen, oven, pH-

meter merk Lutron YK-2001PH, sentrifuse merk Sartorius Sigma, *crushable tang*, timbangan analitik merk Toledo dengan ketelitian 0,001 gr, *washing bottle*, *Waterbath*, *incase*, spektrofotometer merk Thermo Spectronic, Haemocytometer, kerta saring, mikroskop merk Olympus.

3.2 Metode dan Rancangan Percobaan

3.2.1 Metode Penelitian

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

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

3.2.2 Rancangan Percobaan

Rancangan yang digunakan dalam penelitian utama adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan perlakuan adalah konsentrasi pH yang memiliki 5 level, yaitu pH 5, 6, 7, 8 dan 9 yang dikelompokkan berdasarkan lama inkubasi yang memilki 4 level yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam serta

masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Model rancangan percobaan yang digunakan disajikan pada gambar 3. Metode analisa yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + \rho_k + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

dimana: Y_{ijk} = nilai pengamatan pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum

A_i = pengaruh taraf ke-i dari faktor A

B_j = pengaruh taraf ke-j dari faktor B

ρ_k = pengaruh kelompok ke-k

AB_{ij} = pengaruh interaksi taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B

ϵ_{ijk} = galat percobaan taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B pada ulangan yang ke-k.

P1T1U1	P4T1U1	P3T1U2	P1T4U1	P5T2U2	P4T4U1	P5T3U1	P1T3U2
P2T1U1	P5T3U2	P4T3U1	P2T2U1	P5T1U1	P1T2U2	P4T2U2	P2T3U1
P3T2U2	P1T2U1	P4T4U2	P4T1U2	P2T4U2	P3T4U1	P3T1U1	P5T4U2
P2T4U1	P4T3U2	P2T1U2	P5T1U2	P3T2U1	P2T2U2	P5T4U1	P3T4U2
P1T4U2	P5T2U1	P3T3U2	P1T3U1	P4T2U1	P2T3U2	P3T3U1	P1T1U2

Gambar 3. Denah Percobaan

3.2.3 Analisa Data

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

- Jika $F_{hitung} < F_{tabel} 5\%$, maka perlakuan tidak berbeda nyata.
- Jika $F_{hitung} > F_{tabel} 1\%$, maka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata.

- Jika $F \text{ tabel } 5\% < F \text{ hitung} < F \text{ tabel } 1\%$, maka perlakuan menyebabkan hasil berbeda nyata.

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

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat

Tahap awal adalah penumbuhan bakteri proteolitik dari ikan teri asin menggunakan metode Marcy and Pruett dalam Downes and Ito (2001). Sampel berupa bakteri *B. mycoides* didapatkan dari penelitian sebelumnya tentang karakteristik bakteri proteolitik yang diisolasi dari ikan teri asin yang dilakukan oleh Estuningtyas (2010). Media yang digunakan adalah *Skim Milk Agar* (SMA) yang berasal dari *Nutrien Agar* ditambahkan dengan kasein. Metode yang dilakukan saat penanaman adalah metode gores secara *zig-zag* sehingga menggunakan 1 ose sampel. Nutrien agar dan casein (10:1) dilarutkan dengan aquadest (1:5) dan NaCl sebanyak 15% dipanaskan sampai homogen. Sterilisasi yang dilakukan dengan menggunakan suhu 121°C selama 15 menit kemudian dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml, dibiarkan padat pada posisi miring. Setelah benar-benar padat kemudian media digores dengan 1 ose isolat mikroba secara aseptis dengan metode gores secara *zig zag*. Media yang sudah berisi isolat bakteri kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C . Langkah-langkah dan diagram alir pembuatan kultur stok dapat dilihat pada Lampiran 1. Skema kerja untuk pembuatan kultur stok isolat dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.2 Inokulasi Bakteri *Bacillus mycoides* Pada Media *Luria Bertani Agar*

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

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

Pada tahap produksi crude enzim dimana menggunakan penelitian sebelumnya dilakukan inokulasi pada media pertumbuhan dengan menggunakan media LB agar yang diambil dari kultur stok Isolat bakteri proteolitik yang telah didapatkan dari media *Luria Bertani Agar*, diambil 1 ose kemudian diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Luria Bertani Broth* sebanyak 10 ml. Isolat tersebut kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C kecepatan 120 rpm. Diambil 1 ml kemudian diinokulasikan ke dalam 250 ml media LB Broth steril dan diinkubasi dalam shaker incubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan pembacaan OD setiap 2 jam pada panjang gelombang 660 nm dan diambil 1 ml starter pada absorbansi 0,4-0,5 dimasukkan ke dalam media produksi yang terdiri dari (peptone 10 gram, ekstrak yeast 5 gram, NaCl 10 gram, (NH₄)₂SO₄ 2 gram, K₂HPO₄ 3 gram, KH₂PO₄ 2 gram, MgSO₄·7H₂O 0,5 gram dan 1 liter aquades). Diinkubasi dalam shaker incubator 120 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi kemudian

disentrifuge pada 4000 rpm selama 20 menit dan dibuat larutan enzim dengan menambahkan larutan diluent dengan perbandingan yang sesuai. Skema kerja produksi crude enzim dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.3.4 Pengujian Aktivitas Protease

Pengujian aktivitas protease diawali dengan penyiapan larutan yang akan digunakan, menggunakan metode (Kuswanto,1987):

- 1). Larutan substrat. Larutkan 70 g kasein ke dalam suatu larutan yang mengandung 6,05 g (0,05 M) Tris : Tris (hidroksi metil) amino methane, dan 8,0 ml 1N HCl di dalam $\pm$ 500 ml air. Dipanaskan selama 30 menit dalam waterbath mendidih sambil dilakukan pengadukan kadang-kadang. Didinginkan pada suhu kamar dan diatur pada pH 7,0 dengan menambahkan 140 ml 0,2 N HCl. Kemudian diencerkan menjadi 1000 ml dengan menambahkan aquades. Larutan ini dapat digunakan untuk 5 hari jika disimpan di dalam lemari pendingin.
- 2). Diluent. Diluents dalam hal ini adalah 0,1 N Tris buffer yang mempunyai pH 7,0. Larutan ini diperoleh dengan melarutkan 12,2 g Tris ke dalam aquades, ditambah 90,0 ml HCl dan diencerkan kembali dengan aquades menjadi 1 liter.
- 3). TCA reagent. Larutkan 18,0 g asam trichoroasetat dan 19,0 g natrium asetat ($3 \text{ H}_2\text{O}$) ke dalam air, kemudian diambahkan 20 g asam asetat glacial dan encerkan dengan aquades menjadi 1 liter.
- 4). Larutan Enzim. Ke dalam larutan diluent ditambahkan larutan yang mengandung enzim dengan konsentrasi yang sesuai. Larutan enzim mengandung 5-22 PC unit, dengan absorbansi 0,160-0,700. Langkah-langkah pembuatan larutan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.3.4.1 Cara Penentuan Aktivitas Protease (Kuswanto, 1987)

Metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas protease ini mengacu pada metode yang digunakan oleh Kuswanto (1987). Dimasukkan 5 ml larutan substrat ke dalam tabung reaksi untuk setiap sampel yang akan ditera aktivitasnya, dan dibuat satu tabung untuk blanko. Mula-mula ditambahkan 1 ml

larutan enzim ke dalam tabung. Ke dalam blanko ditambahkan 1 ml diluent. Setelah penambahan enzim segera dilakukan pencampuran sedemikian rupa sehingga larutan substrat dan larutan enzim tercampur merata. Kemudian diinkubasikan selama 6 jam, 12 jam, 18jam dan 24 jam dalam shaker inkubator pada pH 5, 6, 7, 8, dan 9 dengan kecepatan 120 rpm. kemudian ditambahkan 5 ml TCA reagent, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan disaring dengan kertas saring Whatman no.42 (11 cm). Dilakukan pengenceran 1 : 10 dengan aquades dan dimasukkan ke dalam inkubator selama 1 jam. Pembacaan OD (Optical Density) dilakukan pada panjang gelombang 275 nm dan setiap kali distandarisasi dengan blanko. Langkah-langkah penentuan aktivitas protease dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.3.4.2 Kurva Standart Tirosin (Kuswanto,1987)

Dalam pembuatan kurva standard tirosin mengacu pada metode yang digunakan oleh KUswanto (1987). Larutkan 100 mg L-tirosin dimasukkan ke dalam 60 ml 0,1 N HCl. Setelah tirosin betul-betul terlarut sempurna barulah dicampurkan dengan aquades menjadi 1 liter. Larutan ini mengandung 100 µg tirosin/ml. Lalu disiapkan 3 macam larutan yang mengandung 25,40 dan 75 µg tirosin/ml, dan diukur masing-masing absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm. Hasil pembacaan OD-nya digambar sehingga akan diperoleh suatu grafik garis lurus yang melalui titik pusat. Diambil nilai untuk 60 µg tirosin/ml dari grafik itu dan dibagi nilai itu dengan 40 sehingga diperoleh nilai absorbansinya absor 0,003117 untuk 1,50 µg tirosin/ml

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

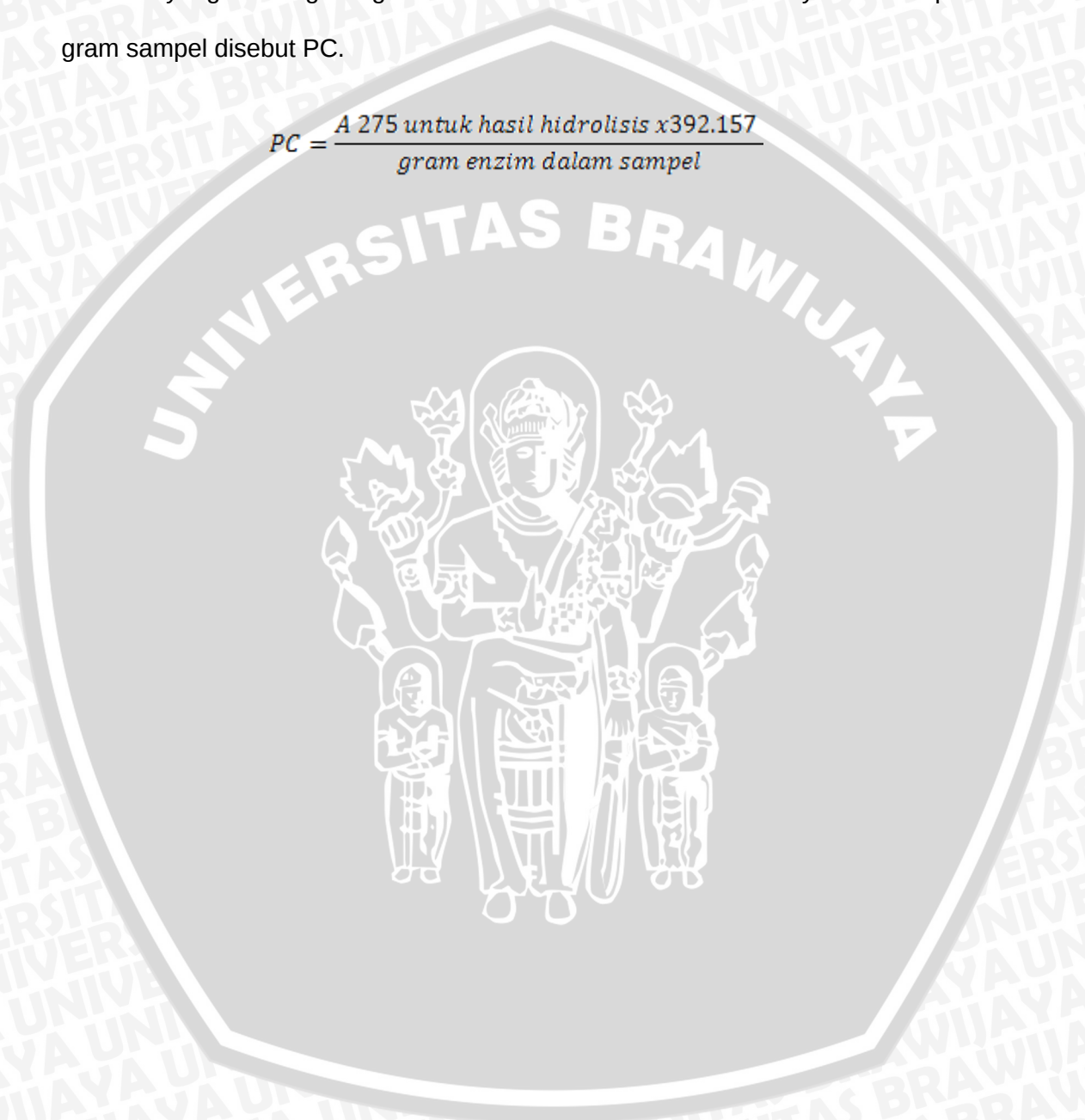
$$\frac{A_{275 \text{ untuk hasil hidrolisis}}}{A_{275 \text{ untuk } 1,50 \text{ g tirosin/ml}}} \times \frac{\text{volume}}{\text{waktu}} =$$

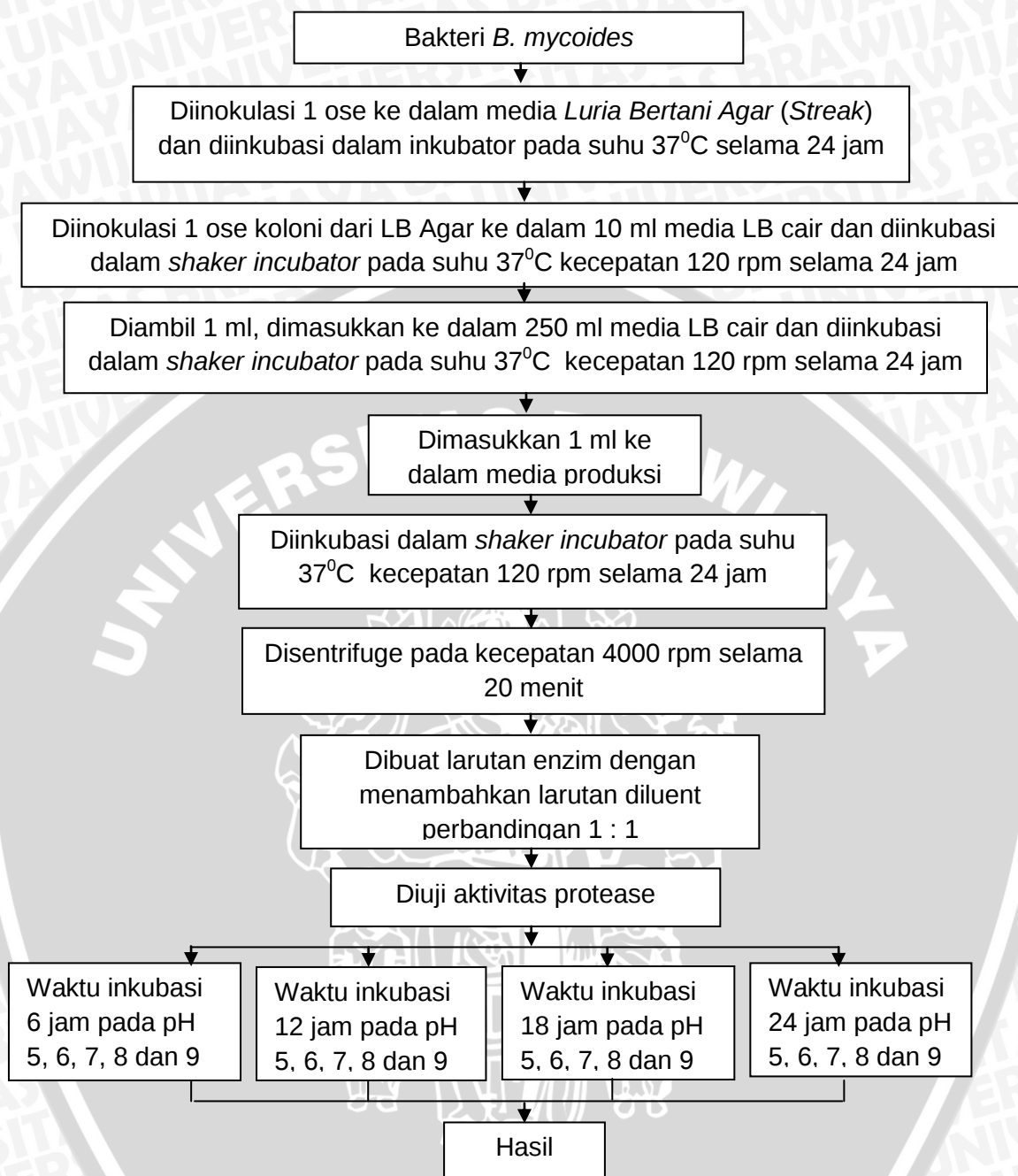
$$\frac{A_{275} \text{ untuk hasil hidrolisis}}{0,003117} \times \frac{11}{30} \times \frac{10}{3} =$$

A 275 untuk hasil hidrolisis x392.157 =

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

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





Gambar 4. Diagram Alir Prosedur Penelitian

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Analisis Aktivitas Protease dengan Perlakuan pH

Analisis yang dilakukan pada perlakuan pH ini menggunakan lima pH yang berbeda yaitu 5, 6, 7, 8, 9. Data hasil analisis perlakuan pH dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 5.

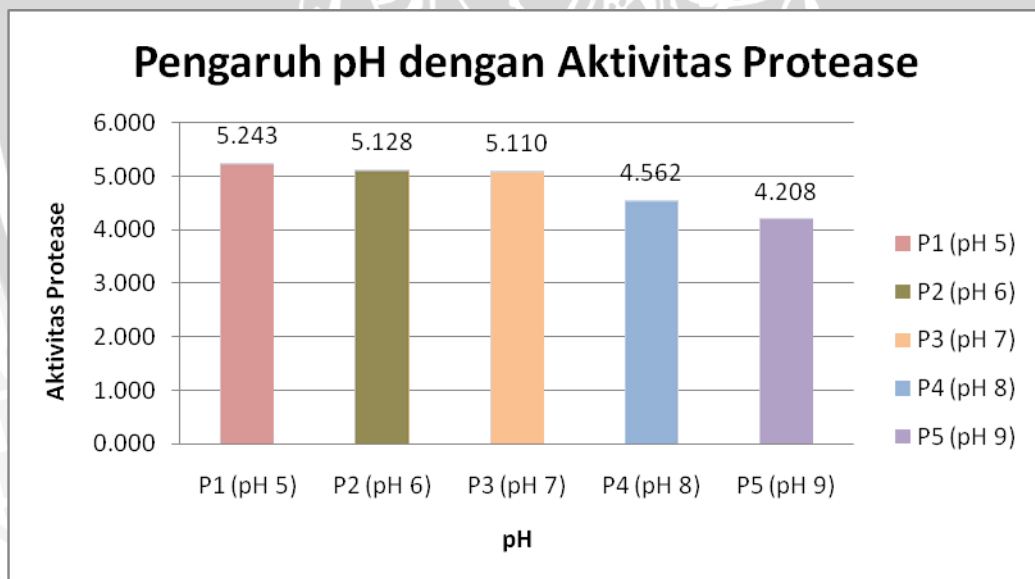
Tabel 1. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pH Terhadap Aktivitas Protease

pH	PC Unit	Notasi
5	5.243	c
6	5.128	c
7	5.110	c
8	4.562	b
9	4.208	a

Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata

Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata



Gambar 5. Pengaruh pH dengan Aktivitas Protease *Bacillus mycoides*

Dari hasil pengamatan didapatkan aktivitas enzim terendah pada pH 9 (basa) yaitu sebesar 4,208 U/mL. Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada pH 5 (asam) yaitu sebesar 5,243 U/mL. Hal yang sama ditunjukkan oleh Mukherjee,

et. al., (2010), dimana didapatkan aktivitas protease optimum dari *Bacillus mycoides* KUCr1 terdapat pada pH 5. Kesamaan pH maksimum ini diduga spesies dari bakteri yang sama yaitu *Bacillus mycoides* karena diduga setiap spesies memiliki daya tahan terhadap pH yang berbeda.

Lain halnya ditunjukkan oleh Sumarlin (2010), dimana didapatkan aktivitas protease dari *Bacillus circulans* terdapat pada pH 9. Perbedaan pH maksimum ini diduga karena berbeda spesies dan media yaitu menggunakan air rendaman kedelai yang lebih baik dari media standar untuk menghasilkan protease karena kedelai memiliki kandungan protein yang cukup tinggi sebagai sumber nitrogen bagi mikroorganisme.

Bakteri *Bacillus mycoides* mampu memproduksi enzim dengan maksimal pada pH 5 yang bersifat basa. pH mempengaruhi aktivitas enzim protease kasar yang dihasilkan oleh isolat. Enzim protease aktivitas optimumnya berada pada pH 5. Aktivitas protease isolat terlihat meningkat mulai dari pH 5 – pH 7 dan mulai menurun pada pH 8 – pH 9. Perhitungan aktivitas enzim pada perlakuan pH dapat dilihat pada Lampiran 7.

Data aktivitas protease *Bacillus mycoides* disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 5. Untuk mengetahui apakah perlakuan pH yang berbeda benar-benar berpengaruh terhadap hasil penelitian, maka dilakukan analisis statistik. Berdasarkan hasil analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas protease ($F_{hit} > F_{tab}$). Untuk mengetahui urutan pengaruh perlakuan yang berbeda, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 1.

Aktivitas protease dengan perlakuan pH yang berbeda cenderung mengalami penurunan seiring semakin tinggi pH yang digunakan. Hal ini diduga karena mengalami denaturasi enzim akibat perubahan pH. Menurut Pelczar dan Chan (1986), terjadinya perubahan nilai pH selama proses inkubasi sangat

mempengaruhi kerja enzim karena perubahan pH menyebabkan terjadinya perubahan pada daerah katalitik dan konformasi dari enzim, dimana sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim tersebut sangat mudah dipengaruhi oleh pH.

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

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

4.2 Hasil Analisis Aktivitas Protease dengan Perlakuan Waktu Inkubasi

Sedangkan analisis yang dilakukan pada perlakuan waktu inkubasi ini menggunakan empat waktu yang berbeda yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam. Data hasil analisis perlakuan waktu inkubasi dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 6.

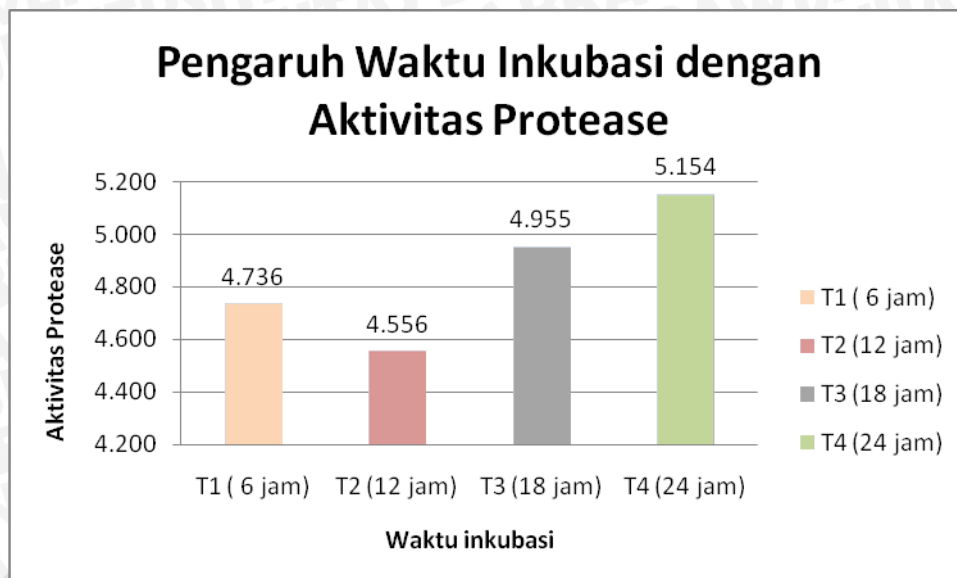
Tabel 2. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Waktu Inkubasi

Waktu Inkubasi	PC Unit	Notasi
6	4.736	a
12	4.556	a
18	4.955	ab
24	5.154	b

Keterangan:

Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan nyata

Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata



Gambar 6. Pengaruh Waktu Inkubasi dengan Aktivitas Protease

Dari hasil pengamatan didapatkan aktivitas enzim protease terendah pada waktu inkubasi T2 (12 jam) yaitu sebesar 4,556 U/mL. Aktivitas enzim protease tertinggi terdapat pada waktu inkubasi T4 (24 jam) yaitu sebesar 5,154 U/mL. Hal ini sesuai dengan pengamatan yang dilakukan Alves, *et al.*, (2005) dalam Choliq (2008), enzim mulai mensintesa protease pada jam 24 inkubasi tetapi tingginya aktivitas protease tidak selalu dipengaruhi oleh konsentrasi biomassa dan fase pertumbuhannya.

Lain halnya ditunjukkan oleh Susanti (2002), dimana didapatkan aktivitas protease dari *Bacillus subtilis* terdapat pada waktu inkubasi 6 jam. Perbedaan waktu inkubasi ini diduga karena berbeda spesies karena setiap spesies memiliki masa pertumbuhan yang berbeda pula.

Data aktivitas protease *Bacillus mycoides* disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 6. Untuk mengetahui apakah perlakuan waktu inkubasi yang berbeda benar-benar berpengaruh terhadap hasil penelitian, maka dilakukan analisis statistik. Berdasarkan hasil analisa sidik ragam menunjukan bahwa perlakuan waktu inkubasi yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas protease ($F_{hit} > F_{tab}$). Untuk mengetahui urutan pengaruh perlakuan

yang berbeda, maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 2.

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 terdapat pada akhir fase eksponensial.

Hal ini sesuai dengan Ward (1983), dalam Sumarlin (2008), pembentukan enzim protease mulai meningkat selama memasuki fase eksponensial, kemudian meningkat selama dengan cepat memasuki stationer. Dalam keadaan normal sintesis enzim ekstraseluler maksimum terjadi sebelum fase stationer atau akhir fase eksponensial menjelang fase stationer (Scafer, 1969).

Tingginya produksi enzim pada fase eksponensial ini diduga berhubungan dengan proses sporulasi yang cepat dan mengalami penurunan sejalan dengan menurunnya proses sporulasi. Produksi enzim sejajar dengan kurva pertumbuhan dan mencapai optimal pada akhir fase eksponensial (Kumalaningsih, 1989).

Hasil analisa aktivitas protease pada *Bacillus mycoides* yang diberi perlakuan pH dengan waktu inkubasi menunjukkan bahwa aktivitas protease maksimum terdapat pada waktu inkubasi jam ke 24 dengan pH 5. Hal ini menunjukkan bahwa *Bacillus mycoides* merupakan bakteri yang tahan terhadap kondisi asam pada waktu inkubasi jam ke 24 dan belum mengalami penurunan aktivitas berkaitan dengan kegiatan menghidrolisis di antara protease pada saat substrat sudah mulai berkurang. Dengan kata lain substrat memiliki kandungan proein yang cukup tinggi. Hasil yang sama diperoleh dari Sumarlin (2008), dimana aktivitas protease tertinggi pada waktu inkubasi jam ke 24 karena menggunakan media yang memiliki kandungan protein yang tinggi.

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



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai aktivitas enzim protease kasar *Bacillus mycoides* dari ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dapat disimpulkan bahwa:

- Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada pH 5 (asam) yaitu sebesar 5,243 Unit/mL. Bakteri *Bacillus mycoides* mampu memproduksi enzim dengan maksimal pada pH 5 yang bersifat asam.
- Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada jam ke 24, yaitu sebesar 5,154 U/mL. Bakteri *Bacillus mycoides* mampu memproduksi enzim dengan maksimal pada jam ke 24 kondisi ini bertepatan dengan akhir fase logaritmik dari fase pertumbuhan mikroba.
- Dari hasil analisa menunjukkan bahwa pH memberikan pengaruh berbeda nyata yang berarti pH memberikan pengaruh yang lebih besar daripada perlakuan dengan waktu inkubasi.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang pemurnian enzim protease dari bakteri *Bacillus mycoides* yang mempunyai potensi tinggi terhadap kebutuhan akan enzim protease bagi masyarakat khususnya di bidang industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriyani, D. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Halofilik dari Ikan Asin. <http://google.com/halofilik/IkanAsin.php>. Diakses 30 Agustus 2009.
- Al-Hikmah. 2010. Jenis dan Sifat Enzim. Diakses melalui <http://biohikmah.blogspot.com/2010/10/jenis-dan-sifat-enzim.html>. Pada Tanggal 15 Oktober 2010
- Apsari, A. A. 2011. Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Proteolitik Berdaya Kuat dari Ikan Kuniran (*Upeneus Sulphureus*) dan Jambal Roti Manyung (*Arius thalassinus*) Asin Berformalin. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet and M. Wootton. 2007. Ilmu Pangan. Penerjemah H. Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Choliq, A. 2008. Aktivitas Enzim Protease dari *Mucor javanicus* yang Ditumbuhkan pada Media Tepung Singkong (*Mannihot utilissima*). LIPI. Cibinong
- Darwis dan Sukara, (1990), Penuntun Praktikum Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim, IPB, Bogor.
- Downes, F. P. and K. Ito. 2001. *Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Food*. American Public Health Association. Washington, D. C.
- Fatimah, I. 2005. Isolasi Bakteri Proteolitik dari Pencernaan Ikan Nila Galur Gift (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas) dan Karakterisasi Protease Ekstraselulernya. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor.
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor. Bogor
- _____. 1992. Mikrobiologi Pangan I. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- _____. 1993. Analisis Mikrobiologi Pangan. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Grata, K., Nabrdalik, M., Latala, A. 2010. *Evaluation of Proteolytic Activity of Bacillus mycoides Strains*. Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski. Vol 4 No. 2
- Hidayat, N., M.C. Padaga dan S. Suhartini. 2006. Mikrobiologi Industri. Andi. Yogyakarta

Holt. G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. & Williams, S.T. 2000. *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore: William and Wilkins Baltimore.

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.

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

Kumalaningsih, S.1989. isolasi dan Pemurnian EnzimProteolitik dari Bakteri Halofilik Moderat. Jawa Pos. Surabaya.

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

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

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

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

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

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

Mukherjee, S. M., Chatterjee, S and Sau. 2010. *Chromate Reduction by Cell-Free of Bacillus firmus KUCr1*. Department of Microbiology. University of Kalyani. Kalyani. India

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

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.

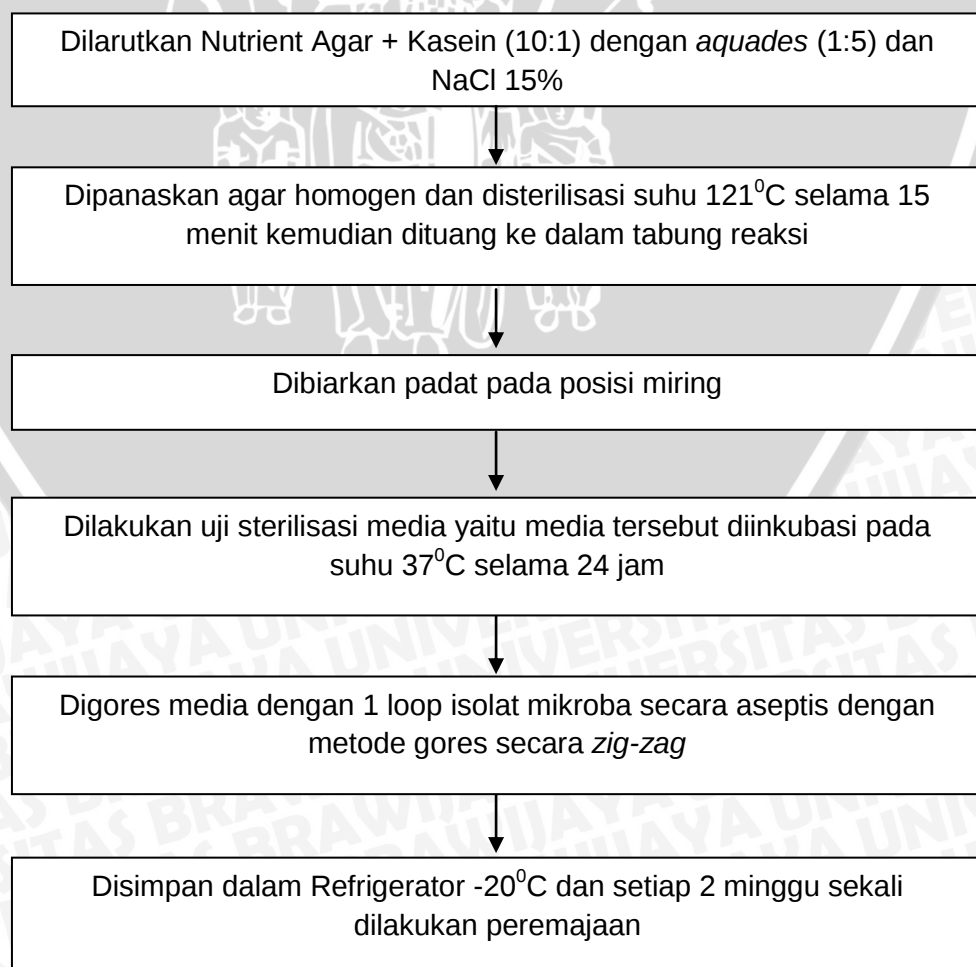
- Prabowo, N.2011. Karakteristik Bakteri Proteolitik yang diisolasi dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*)asin. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang
- Putranto., Wendy S. 2006. Purifikasi dan Karakterisasi Protease yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam Fermentasi Susu Sapi Perah. Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI.
- Qadar, S. A. U., Shireen E., Iqbal S., Anwar A. 2009. *Optimizaton of protease production from newly isolated strain of Bacillus sp.* Institute of Sustainable Halophyte Utilization and Department of Biochemistry University of Karachi. Pakistan
- Resmiati, T., S. Diana, S. Astuty. 2003. Pengasinan Ikan Teri (*Stolephorus spp.*) dan Kelayakan Usahanya di Desa Karanghantu Serang. Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran Fakultas Pertanian. Bandung.
- Roosdiana, Kartikaningsih, 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
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. hal. 276.
- Seeley jr.H.W. and Vandemark. P.J. 1976. *Selected Exercises From Microbes in Action a Laboratory Manual of Microbiology*. Cornell University. London.
- Schaefer. 1969. Sporulation and Production of Antibiotics, Exoenzyme and Exotoxins. Bacteriol.rev. 33:48-71
- Sperber, M.S, and Torrie, J.H. 1982. *Requirement of Clostridium botulinum for Growth and Toxin Production*. J. Food Tech. 36 (1), 89-97.
- 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.
- Wikipedia. 2009. Teri. <http://Teri/Wikipedia.id>. Diakses 20 Januari 2012. Pukul 22.00 WIB.

Lampiran 1. Pembuatan Kultur Stok Isolat

1.a Pembuatan Kultur Stok Isolat

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

1.b Skema Pembuatan Kultur Stok Isolat



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

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

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

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

Peptone 1 g; yeast extract 0,5 g; NaCl 1 g; Agar 1,5 g

Dilarutkan ke dalam 100 ml *aquades*

Dihomogenkan

Disterilisasi

Dituang pada cawan ± 20 ml

Ditunggu sampai beku

Diinokulasikan 1 ose *B. mycoides* dari kultur stok dengan cara *distreak*

Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam

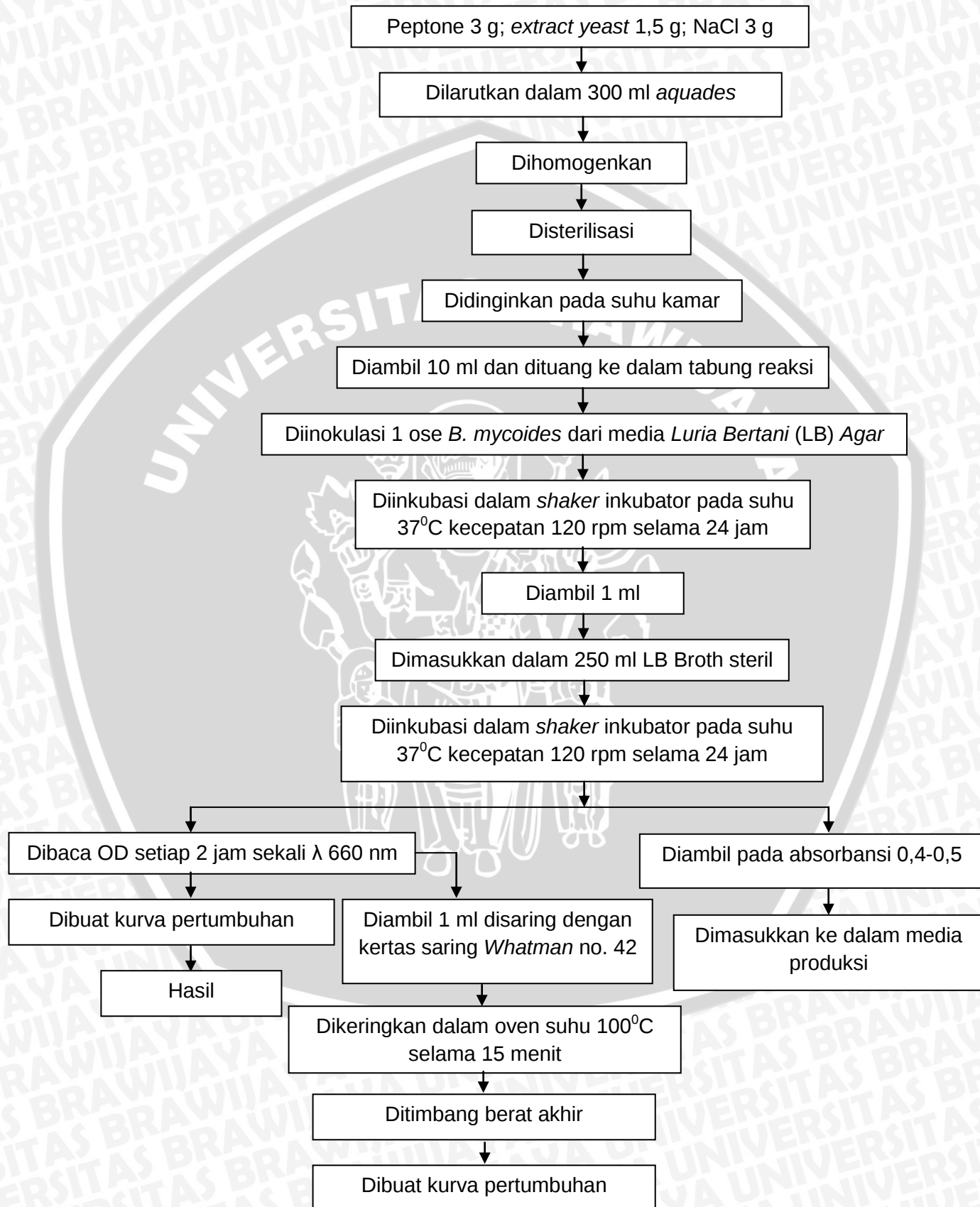
Hasil

Lampiran 3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

3. a. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

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

3. b. Skema Pembuatan Kurva Pertumbuhan



Lampiran 4. Produksi *Crude Enzim*

4. a. Produksi *Crude Enzim*

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



4. b. Skema Produksi Crude Enzim

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

Dilarutkan dengan *aquades* menjadi 1 liter

Diatur pH menjadi 7

Disterilisasi

Ditunggu sampai dingin pada suhu kamar

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

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

Disentrifuge pada 4000 rpm selama 20 menit

Dibuat larutan enzim dengan menambahkan larutan
diluent dengan perbandingan yang sesuai

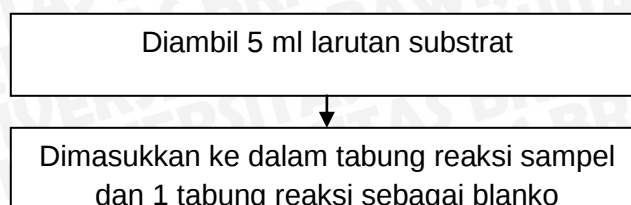
Larutan enzim

Lampiran 5. Analisis Aktivitas Protease

5. a. Penentuan pH Optimum dan Waktu Inkubasi (Kuswanto, 1987)

- Diambil 5 ml larutan substrat
- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi sampel dan 1 tabung reaksi sebagai blanko
- Dimasukkan ke dalam *waterbath* suhu 37 °C selama 5 menit
- Ditambahkan 1 ml larutan enzim ke dalam tabung reaksi sampel dan 1 ml larutan diluents ke dalam tabung reaksi blanko
- Dihomogenkan
- Diinkubasi selama 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam pada pH 5; pH 6; pH 7; pH 8 dan pH 9
- Ditambahkan 5 ml TCA *reagent*
- Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C
- Disaring dengan kertas saring *Whatman* no. 42
- Diencerkan 1 : 10 dengan *aquades*
- Dimasukkan ke dalam inkubator selama 1 jam
- Dibaca OD pada 275 nm

5. b. Skema Penentuan pH Optimum dan Waktu Inkubasi



Lampiran 6. Pembuatan Larutan

1. a. Pembuatan Larutan Substrat

- Larutan yang mengandung 3,025 g (0,05 M) Tris (hidroksi metil) *amino methane* dan 4 ml 1 N HCl dimasukkan dalam *aquades* 250 ml
- Ditambahkan 35 g kasein pekat
- Dipanaskan 30 menit dalam *waterbath* suhu 100° C
- Dihomogenkan
- Didinginkan pada suhu kamar
- Diatur pH 7 dengan menambahkan HCl 70 ml 0,2 N
- Diencerkan menjadi 500 ml dengan *aquades*

1. b. Skema Pembuatan Larutan substrat

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

Ditambahkan 35 g kasein pekat

Dipanaskan 30 menit dalam *waterbath* suhu 100° C

Dihomogenkan

Didinginkan pada suhu kamar

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

Diencerkan menjadi 500 ml dengan *aquades*

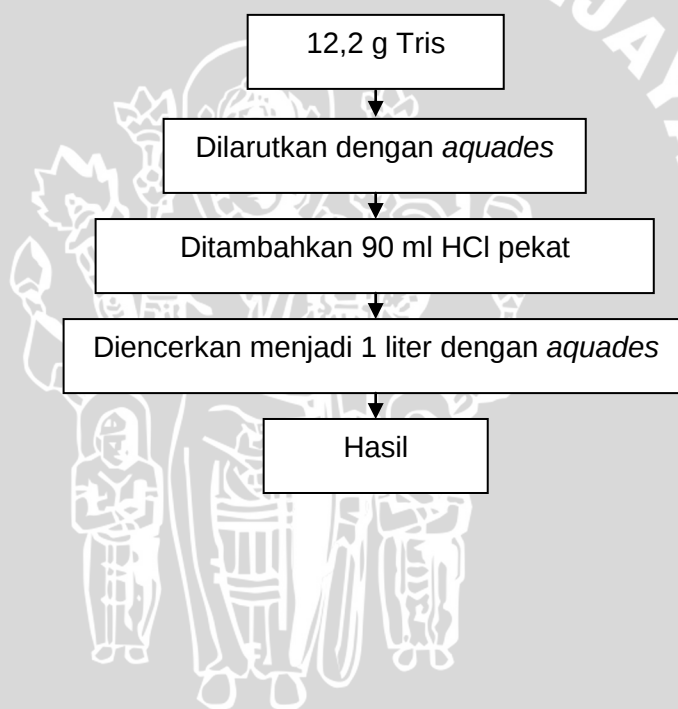
Hasil

Lampiran 6. Lanjutan

2. a. Pembuatan Larutan Diluent

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

2. b. Skema Pembuatan Larutan Diluent

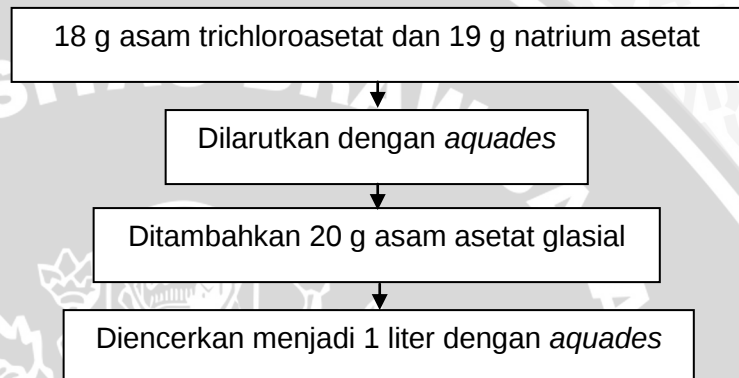


Lampiran 6. Lanjutan

3. a. Pembuatan TCA Reagent

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

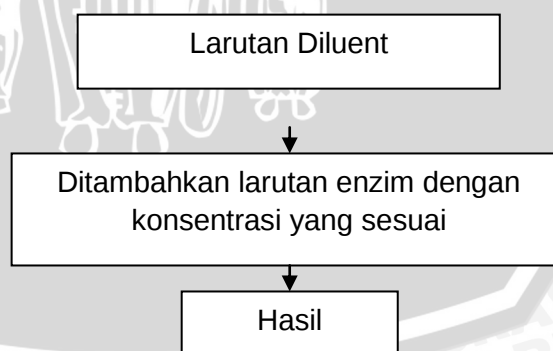
3. b.TCA Reagent



4. a. Pembuatan Larutan Enzim

- Larutan Diluent ditambah dengan larutan enzim dengan konsentrasi yang sesuai

4. b. Skema Pembuatan Larutan Enzim



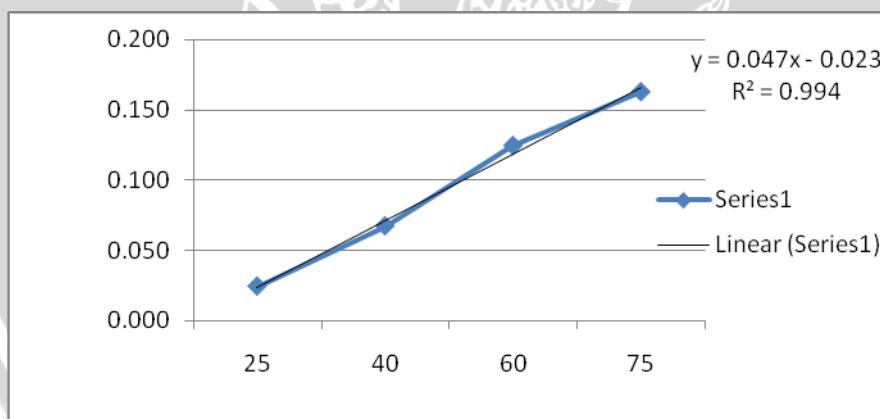
- Larutan enzim mempunyai absorbansi antara 0,160-0,700

Lampiran 7. Data Penelitian

Hasil Pengaruh pH dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Protease

Perlakuan	Waktu inkubasi 6 jam		Waktu inkubasi 12 jam		Waktu inkubasi 18 jam		Waktu inkubasi 24 jam	
	1	2	1	2	1	2	1	2
pH 5	0.111	0.110	0.125	0.110	0.136	0.157	0.213	0.270
pH 6	0.065	0.090	0.097	0.100	0.086	0.105	0.170	0.123
pH 7	0.087	0.062	0.059	0.069	0.120	0.104	0.179	0.250
pH 8	0.043	0.051	0.042	0.021	0.070	0.042	0.082	0.056
pH 9	0.017	0.015	0.014	0.020	0.024	0.039	0.052	0.062

Grafik Standart Tirosin



Dimana:

a=0.024

b=0.067

c=0.125

d=0.163

Tabel.... Hasil Pengaruh pH dan Waktu Inkubasi Berdasarkan Grafik Standart
Tirosin.

Perlakuan	Waktu inkubasi		Waktu inkubasi		Waktu inkubasi		Waktu inkubasi	
	6 jam		12 jam		18 jam		24 jam	
	1	2	1	2	1	2	1	2
pH 5	25.319	25.035	28.227	24.965	30.567	35.035	46.879	59.007
pH 6	15.390	20.709	22.340	22.979	19.858	23.972	37.872	27.801
pH 7	20.142	14.752	14.113	16.241	27.163	23.759	39.716	54.752
pH 8	10.709	12.411	10.496	8.794	16.525	10.496	19.078	13.546
pH 9	5.319	4.823	4.681	5.957	6.738	9.929	12.766	14.823

Tabel Gram Enzim Dalam Sampel

Perlakuan		Ulangan		rata2	mikrogram Tirosin		PC Unit	
		1	2		1	2	1	2
ph 5	T1	0.334	0.330	0.332	25.319	25.035	5.173	5.169
	T2	0.375	0.329	0.352	28.227	24.965	5.210	5.168
	T3	0.408	0.471	0.440	30.567	35.035	5.234	5.272
	T4	0.638	0.809	0.724	46.879	59.007	5.337	5.377
Ph 6	T1	0.194	0.269	0.232	15.390	20.709	4.943	5.094
	T2	0.292	0.301	0.297	22.340	22.979	5.126	5.137
	T3	0.257	0.315	0.286	19.858	23.972	5.075	5.153
	T4	0.511	0.369	0.440	37.872	27.801	5.291	5.205
ph 7	T1	0.261	0.185	0.223	20.142	14.752	5.082	4.918
	T2	0.176	0.206	0.191	14.113	16.241	4.890	4.974
	T3	0.360	0.312	0.336	27.163	23.759	5.197	5.150

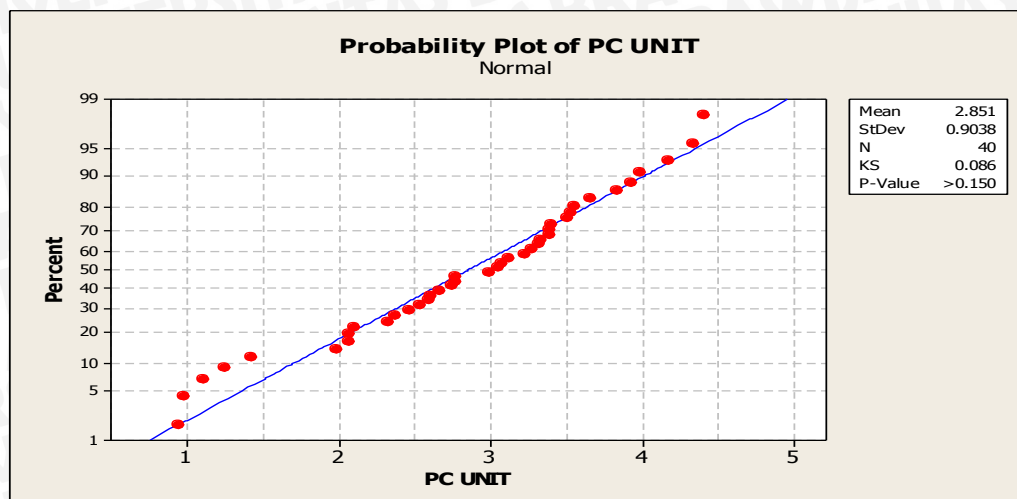
	T4	0.537	0.749	0.643	39.716	54.752	5.302	5.365
ph 8	T1	0.128	0.152	0.140	10.709	12.411	4.687	4.803
	T2	0.125	0.062	0.094	10.496	8.794	4.670	2.765
	T3	0.210	0.125	0.168	16.525	10.496	4.984	4.670
	T4	0.246	0.168	0.207	19.078	13.546	5.057	4.864
ph 9	T1	0.052	0.045	0.049	5.319	4.823	3.834	3.659
	T2	0.043	0.061	0.052	4.681	5.957	3.602	4.015
	T3	0.072	0.117	0.095	6.738	9.929	4.191	4.621
	T4	0.157	0.186	0.172	12.766	14.823	4.823	4.921



Tabel PC unit Dalam Sampel

PERLAKUAN	ULANGAN		TOTAL	RERATA
	1	2		
P1T1	5.173	5.169	10.342	5.171
P1T2	5.210	5.168	10.378	5.189
P1T3	5.234	5.272	10.506	5.253
P1T4	5.337	5.377	10.714	5.357
P2T1	4.943	5.094	10.037	5.019
P2T2	5.126	5.137	10.263	5.131
P2T3	5.075	5.153	10.228	5.114
P2T4	5.291	5.205	10.496	5.248
P3T1	5.082	4.918	10.000	5.000
P3T2	4.890	4.974	9.864	4.932
P3T3	5.197	5.150	10.347	5.174
P3T4	5.302	5.365	10.667	5.333
P4T1	4.687	4.803	9.490	4.745
P4T2	4.670	2.765	7.435	3.717
P4T3	4.984	4.670	9.654	4.827
P4T4	5.057	4.864	9.920	4.960
P5T1	3.834	3.659	7.493	3.746
P5T2	3.602	4.015	7.618	3.809
P5T3	4.191	4.621	8.812	4.406
P5T4	4.823	4.921	9.744	4.872

NORMALITAS DATA



P-value > 0,05 artinya data terdistribusi normal

Two-way ANOVA: PC Unit versus Lama Inkubasi, pH

Source	DF	SS	MS	F	P
Lama Inkubasi	3	2.0306	0.67688	6.36	0.003
pH	4	6.3465	1.58662	14.91	0.000
Interaction	12	1.9173	0.15977	1.50	0.204
Error	20	2.1277	0.10638		
Total	39	12.4220			

S = 0.3262 R-Sq = 82.87% R-Sq(adj) = 66.60%

One-way ANOVA: PC Unit versus pH

Source	DF	SS	MS	F	P
pH	4	6.346	1.587	9.14	0.000
Error	35	6.076	0.174		
Total	39	12.422			

S = 0.4166 R-Sq = 51.09% R-Sq(adj) = 45.50%

Individual 95% CIs For Mean Based on

Pooled StDev



Pooled StDev = 0.4166

One-way ANOVA: PC Unit versus Lama Inkubasi

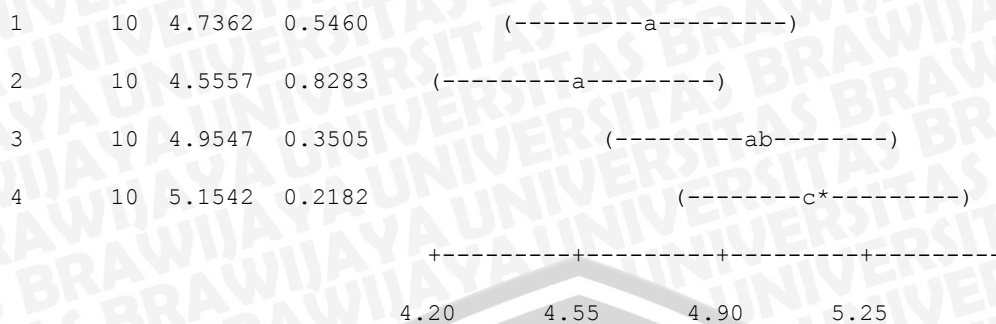
Source	DF	SS	MS	F	P
Lama Inkubasi	3	2.031	0.677	2.34	0.089
Error	36	10.391	0.289		
Total	39	12.422			

S = 0.5373 R-Sq = 16.35% R-Sq(adj) = 9.38%

Individual 95% CIs For Mean Based on

Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
-------	---	------	-------



Pooled StDev = 0.5373

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 7. Lanjutan

Perhitungan Data:

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

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

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

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

pH 5

6 jam

1. 0,334

$$PC = \frac{0,334 \times 392,157}{25,319} = 5,173$$

2. 0,330

$$PC = \frac{0,330 \times 392,157}{25,035} = 5,169$$

18 jam

1. 0,408

$$PC = \frac{0,408 \times 392,157}{30,567} = 5,235$$

2. 0,471

12 jam

1. 0,375

$$PC = \frac{0,375 \times 392,157}{26,227} = 5,210$$

2. 0,329

$$PC = \frac{0,329 \times 392,157}{24,965} = 5,168$$

24 jam

1. 0,638

$$PC = \frac{0,638 \times 392,157}{46,879} = 5,337$$

2. 0,809

$$PC = \frac{0471 \times 392,157}{35,035} = 5,272$$

$$PC = \frac{0,809 \times 392,157}{59,007} = 5,377$$

pH 6

6 jam

1. 0,194

$$PC = \frac{0,194 \times 392,157}{15,390} = 4,943$$

12 jam

1. 0,292

$$PC = \frac{0,292 \times 392,157}{22,340} = 5,210$$

2. 0,296

$$PC = \frac{0,296 \times 392,157}{20,709} = 5,094$$

2. 0,329

$$PC = \frac{0,329 \times 392,157}{24,965} = 5,168$$

18 jam

1. 0,257

$$PC = \frac{0,257 \times 392,157}{19,858} = 5,075$$

24 jam

1. 0,511

$$PC = \frac{0,511 \times 392,157}{37,872} = 5,291$$

2. 0,315

$$PC = \frac{0,351 \times 392,157}{23,927} = 5,153$$

2. 0,369

$$PC = \frac{0,369 \times 392,157}{27,801} = 5,205$$

pH 7

6 jam

1. 0,261

$$PC = \frac{0,261 \times 392,157}{20,142} = 5,082$$

12 jam

1. 0,176

$$PC = \frac{0,176 \times 392,157}{14,113} = 4,890$$

2. 0,185

$$PC = \frac{0,185 \times 392,157}{14,752} = 4,918$$

2. 0,206

$$PC = \frac{0,206 \times 392,157}{16,241} = 4,974$$

18 jam

24 jam

1. 0,360

$$PC = \frac{0,360 \times 392,157}{27,169} = 5,197$$

1. 0,537

$$PC = \frac{0,537 \times 392,157}{39,716} = 5,302$$

2. 0,312

$$PC = \frac{0,312 \times 392,157}{23,759} = 5,150$$

2. 0,749

$$PC = \frac{0,749 \times 392,157}{54,752} = 5,365$$

pH 8

6 jam

12 jam

1. 0,128

$$PC = \frac{0,128 \times 392,157}{10,709} = 4,687$$

1. 0,125

$$PC = \frac{0,125 \times 392,157}{10,496} = 4,670$$

2. 0,152

$$PC = \frac{0,152 \times 392,157}{12,411} = 4,803$$

2. 0,062

$$PC = \frac{0,062 \times 392,157}{8,794} = 2,765$$

18 jam

24 jam

1. 0,210

$$PC = \frac{0,210 \times 392,157}{16,525} = 4,984$$

1. 0,246

$$PC = \frac{0,246 \times 392,157}{19,078} = 5,057$$

2. 0,125

$$PC = \frac{0,125 \times 392,157}{10,496} = 4,670$$

2. 0,168

$$PC = \frac{0,168 \times 392,157}{13,546} = 4,864$$

pH 9

6 jam

1. 0,052

$$PC = \frac{0,052 \times 392,157}{5,319} = 3,834$$

12 jam

1. 0,043

$$PC = \frac{0,043 \times 392,157}{4,681} = 3,602$$

2. 0,045

$$PC = \frac{0,045 \times 392,157}{4,823} = 3,659$$

2. 0,061

$$PC = \frac{0,061 \times 392,157}{5,957} = 4,015$$

18 jam

1. 0,072

$$PC = \frac{0,072 \times 392,157}{6,738} = 4,191$$

24 jam

1. 0,157

$$PC = \frac{0,157 \times 392,157}{12,766} = 4,823$$

2. 0,117

$$PC = \frac{0,117 \times 392,157}{9,929} = 4,621$$

2. 0,186

$$PC = \frac{0,186 \times 392,157}{14,823} = 4,921$$

Lampiran 7. Lanjutan

Tabel 2 Arah

P/T	6	12	18	24	rerata
5	5.171	5.189	5.253	5.357	5.243
6	5.019	5.131	5.114	5.248	5.128
7	5.000	4.932	5.174	5.333	5.110
8	4.745	3.717	4.827	4.960	4.562
9	3.746	3.809	4.406	4.872	4.208
rerata	4.736	4.556	4.955	5.154	

Perhitungan Jumlah Kuadrat (JK):

$$FK = \frac{\sigma^2}{r \times n} = \frac{194,008^2}{40} = 940,974$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= 2,389^2 + 2,258^2 + 0,606^2 + \dots + 2^2 - FK \\ &= 953,40 - 940,97 \\ &= 12,24 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Ulangan} &= \frac{97,709^2 + 96,299^2}{20} - FK \\ &= \frac{18820,480}{20} - 940,974 \\ &= 0,05 \end{aligned}$$

$$\text{JK Perlakuan} = \frac{10,342^2 + 10,378^2 + \dots + 9,744^2}{2} - FK$$

$$= \frac{1902,535}{2} - 940,974$$

$$= 951,267 - 940,974$$

$$= 10,29$$

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

$$= 112,24 - 0,05 - 10,29$$

$$= 2,08$$

$$\text{JK pH} = \frac{41,940^2 + 41,024^2 + \dots + 33,666^2}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{Ulangan}} - FK$$

$$= \frac{41,940^2 + 41,024^2 + \dots + 33,666^2}{4 \times 2} - 940,974$$

$$= 947,321 - 940,974$$

$$= 6,35$$

$$\text{JK Inkubasi} = \frac{47,362^2 + 45,557^2 + \dots + 51,540^2}{\text{Taraf pH} \times \text{Ulangan}} - FK$$

$$= \frac{47,362^2 + 45,557^2 + \dots + 51,540^2}{5 \times 2} - 940,974$$

$$= 943,003 - 940,974$$

$$= 2,03$$

$$\text{JK interaksi} = \text{JK Perlakuan} - \text{JK pH} - \text{JK Inkubasi}$$

$$= 10,29 - 6,35 - 2,03$$

$$= 1,92$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	F-Hit	F 5%
Inkubasi	3	2.03	0.68	6.51	3.10
pH	4	6.35	1.59	15.27	2.87
pH + Inkubasi	12	1.92	0.16	1.54	2.28
Galat	20	2.08	0.10		
Total	39	12.37			



Interaction Plot (data means) for PC Unit

