

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

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

Oleh :

BAGUS INDRIA S.

NIM. 0610830020



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

BAGUS INDRIA S.
0610830020
UB : FPIK - THP

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

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

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

Oleh :
BAGUS INDRIA S.
NIM. 0610830020



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

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

Oleh :

BAGUS INDRIA S.

NIM. 0610830020

Dosen Penguji I

(Ir. Yahya, MP)

NIP. 19630706 199003 1 005

Tanggal :

Dosen Penguji II

(Asep A, Prihanto, S.Pi. MP)

NIP. 19810602 200604 1 001

Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D)

NIP. 19640919 198903 1 002

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)

NIP. 19640726 198903 2 004

Tanggal :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal:

RINGKASAN

BAGUS INDRIA S. Karakteristik Aktivitas Protease Bakteri *Bacillus mycooides* Dari Isolat Ikan Teri (*Stolephorus spp.*) Asin. (di bawah bimbingan Prof. Ir. SUKOSO, M.Sc. Ph.D dan Dr. Ir. HARTATI KARTIKANINGSIH, M.S)

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Biologi dan Medikal (Biomedik) Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang. Pada bulan Desember 2011 sampai bulan Februari 2012. Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk mengetahui tentang karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* dari isolat ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease ini terdiri dari bakteri *Bacillus mycooides* didapatkan dari kultur stok dari penelitian sebelumnya. Aquadest, NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*) didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. *Casein Hammersten* (2% casein dalam 0,05M larutan buffer fosfat pH 7,0), larutan TCA 5%, *tyrosin standart*, Na_2CO_3 0,5M didapatkan dari Panadia Laboratory, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang. Kertas saring Whatman no. 42, pereaksi folin, Na_2CO_3 0,5M, buffer fosfat 0,01M, HCl 0,05M, CaCl_2 2 mmol/L, aluminium foil, alkohol 70% didapatkan dari CV. Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha Blok I no. 238 Malang.

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif atau yang bersifat menjelajah. Untuk mencapai tujuan utama yaitu mengetahui karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* dari isolasi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin. Metode eksploratif yaitu penelitian dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali dan 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.

Karakteristik aktivitas protease dari bakteri *Bacillus mycooides* mempunyai fase log pada jam ke-12 dengan jumlah bakteri 0,590 sel/mL, suhu optimum pada suhu 40°C dengan jumlah bakteri sebesar 1,000 U/menit/mL, pH optimum pada pH 6 dengan jumlah bakteri sebesar 2,407 U/menit/mL, waktu inkubasi selama 12 jam dengan jumlah bakteri 5,843 U/menit/mL serta nilai V_{maks} 0,0106 $\text{mM min}^{-1} \text{L}^{-1}$ dan nilai K_m sebesar $0,8912998 \times 10^{-3}$ mM. Nilai ini dapat menjelaskan bahwa pada kelajuan maksimum ($V_{max} = 0,0106 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), semua sisi aktif enzim akan berikatan dengan substrat dan jumlah kompleks E-S (Enzim Substrat) sama dengan jumlah total enzim yang ada.

Dari penelitian ini dapat disarankan perlu adanya penelitian lagi tentang karakteristik aktivitas enzim protease khususnya bakteri *Bacillus mycooides* dengan metode yang berbeda supaya dapat dibandingkan dengan metode sebelumnya.

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. Ph.D selaku Dosen Pembimbing I, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.S. selaku Dosen Pembimbing II, yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
3. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.
4. Semua pihak yang telah memberi bantuan dan dorongan sehingga laporan ini dapat dapat terselesaikan dengan baik.
5. Tak lupa teman 1 team *Bacillus sp.* yang selalu bersama-sama menyelesaikan penelitian sekaligus laporan skripsi, terima kasih buat kalian semua.

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 khususnya bagi kami pribadi dan pembaca.

Malang, Juni 2012

Penulis



thank for everything



ALLAH S.W.T...

Akhirnyaa seleeesai sudah... Alhamdulillah Ya Rabb... sebuah karya Ku yang ditunggu-tunggu telah selesai, walauupun perlahan taaapi Akuuu yakin paaasti selesai... Semuua hanyalah mimpi tiaada arti tanpa ridho-Mu...

Bapak... Ibu...

Maaf terpaksa harus mengeluarkan uang saku tambahan untuk karya Ku ini... tanpa banyak bertanya selalu memberi yang terbaik buat Ku... walaupun aku tidak benar-benar bisa mengabdikan sesuatu yang sebenarnya menjadi keinginan & mauMu... Dari doa'Mu lah Aku bisa menjalani semuanya... semoga Allah SWT membalas dengan sebuah kedudukan yang terindah disisi-Nya di akhir nanti... Amin...

Team Bacillus sp...

Rek-rek, koen ki kooplak kabeeeh podo karo Akuuu... Kok isoo yoo garap SKRIPSI kelar mari... tapi ga' teerbayangkan klo ga' da kalian², paasti ga' bakalan mari karya Ku iki... Peseen Ku 1,lek koplak ojo nemen². Tak tuukok ne Mizone koen eengko... Sukses buat kalian semua...

Fishtec 2006...

WITA, Fahrul, Ida, Rista, Tyaz, Anggra, Lia, Dini, Ani, Shanti, Ima, Elisa, Ganies, Defi, Pras, Charda, Rohmat, Anjar, Indri, Nepi, Dia, Eka, Ana, Yuka, Anggit, Elek, Prapti, Denok, Putri, ITCHA, Ulul, Rini, Deni, Rina, Sani, Rima, Dimaz, Nunu', Lombok, Anin, Cow, BAYOR, Beni, Budi, AUNUZ, Joko, Ucup, MBOLO, Adit, Iwan, GUNTUR, Alchristo, Samid, Mike (smoga ga' da yg kelupaan). Kalian semua memberi warna dalam dunia kampusku selama ini... Sungguh tak mungkin dilupakan...

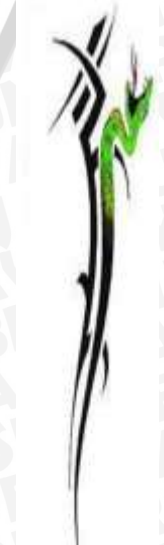
NB : ketambahan 1 rek, wong Ga' Jelaz. Cangkemle sokor ngablak ae MAHBUB jeneng'e... Masio arek'e koplak pool utek e sak team karo aku...

Gank Kandang Babi 229b...

Teeempat tinggal terINDAH yang penuh kePEDIHan... NERAKA buuat oraang goblook tapi SURGA para oraang² peCINTA kehidupan yang sebeeenarnya orang yang ingin HIDUP di dunia... Thank's For All... cepeet LULUZ rek, kampuuuus mari ngeeene dileeedak ne... Ati-ati yoooo, Akuuu LULUZ disik'an...



BAGUS INDRIA S.
PARTNER in CRIME
(315)



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
LEMBAR PERSEMBAHAN	iv
DAFTAR ISI	v
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 Tempat dan Waktu Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Bacillus mycooides</i>	5
2.2 Bakteri Proteolitik	6
2.3 Enzim Protease	7
2.4 Isolasi Bakteri Proteolitik	9
2.5 Karakteristik Bakteri Proteolitik	10
2.6 Kurva Pertumbuhan	11
2.6.1 Analisa Gravimetri	13
2.6.2 Analisa <i>Optical Density</i>	13
2.6.3 Analisa Perhitungan Langsung	14
2.7 Pengujian Aktivitas Protease	16
2.8 Penentuan K_m dan V_{maks}	17
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	19
3.1.1 Bahan Penelitian	19
3.1.2 Alat Penelitian	19
3.2 Metode Penelitian	20
3.3 Prosedur Penelitian	20
3.3.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat	20
3.3.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus mycooides</i>	21
3.3.2.1 Analisa Gravimetri	22
3.3.2.2 Analisa <i>Optical density</i>	22
3.3.2.3 Analisa Analisa Perhitungan Langsung	23
3.3.3 Produksi Enzim (<i>crude enzim</i>)	23
3.3.4 Pengujian Aktivitas Protease	23
3.3.4.1 Penentuan Suhu Optimum	25
3.3.4.2 Penentuan pH Optimum	25
3.3.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi	25
3.3.4.4 Penentuan V_{maks} dan K_m	25
3.4 Skema Kerja Penelitian	28

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

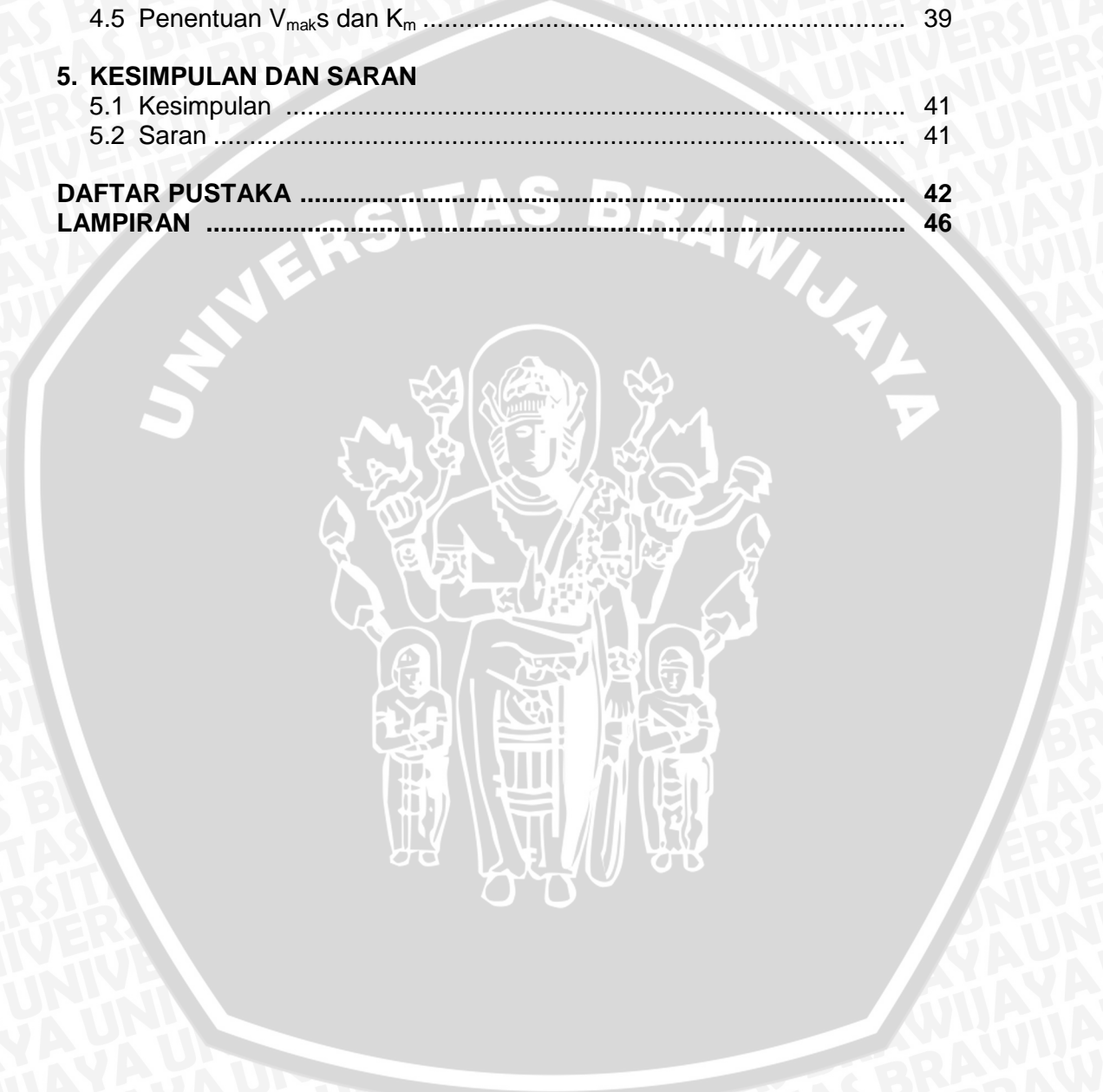
4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik	29
4.1.1 Kurva Pertumbuhan (Metode Gravimetri)	29
4.1.2 Kurva Pertumbuhan (Metode Hitung Langsung)	31
4.1.3 Kurva Pertumbuhan (Metode <i>Optical Density</i>)	32
4.2 Hasil Analisis Aktivitas Protease Pada Perlakuan Suhu	34
4.3 Hasil Analisis Aktivitas Protease Pada Perlakuan pH	36
4.4 Hasil Analisis Aktivitas Protease Pada Perlakuan Waktu Inkubasi	37
4.5 Penentuan V_{maks} dan K_m	39

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41

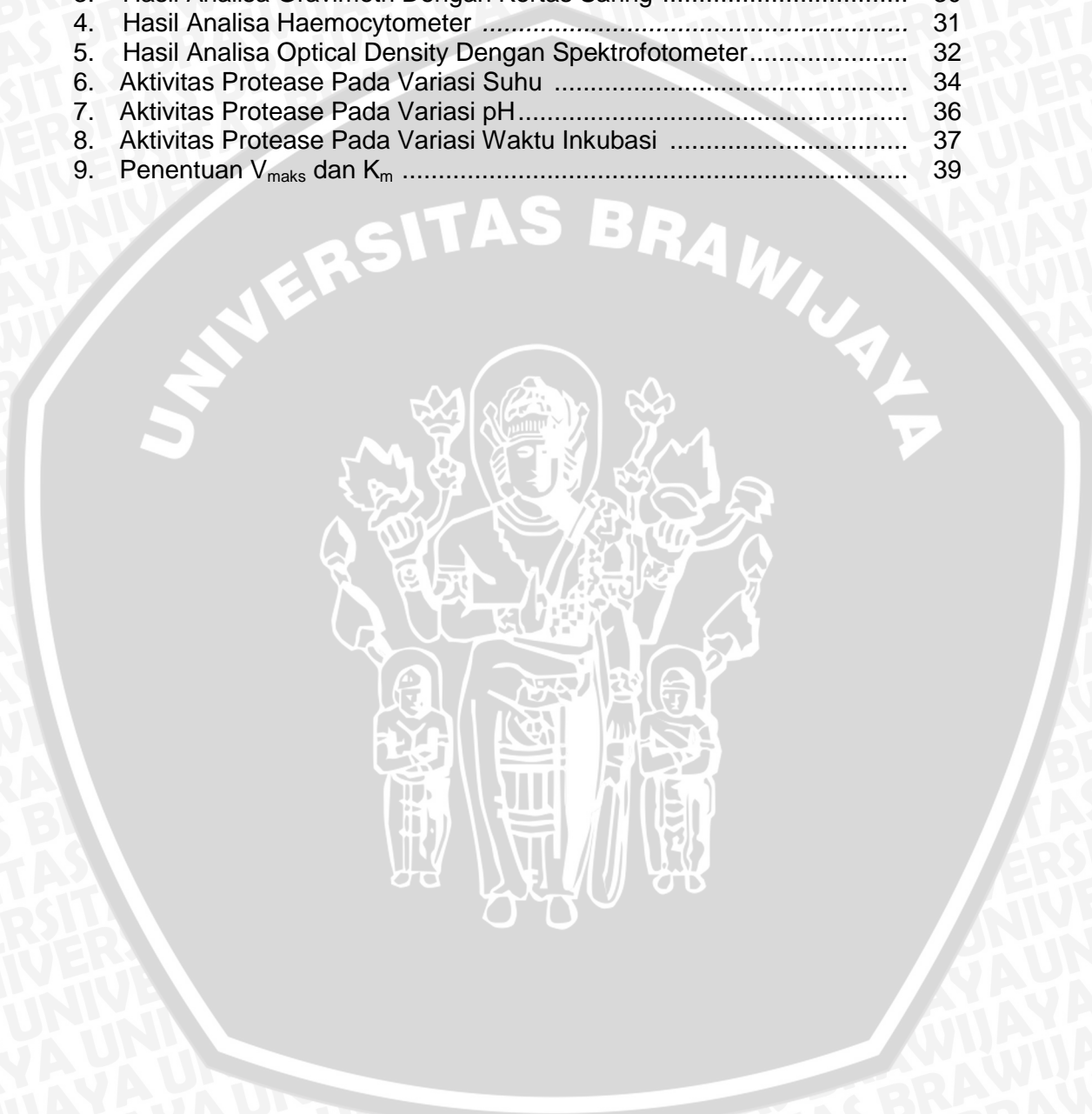
DAFTAR PUSTAKA	42
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN	46
-----------------------	-----------



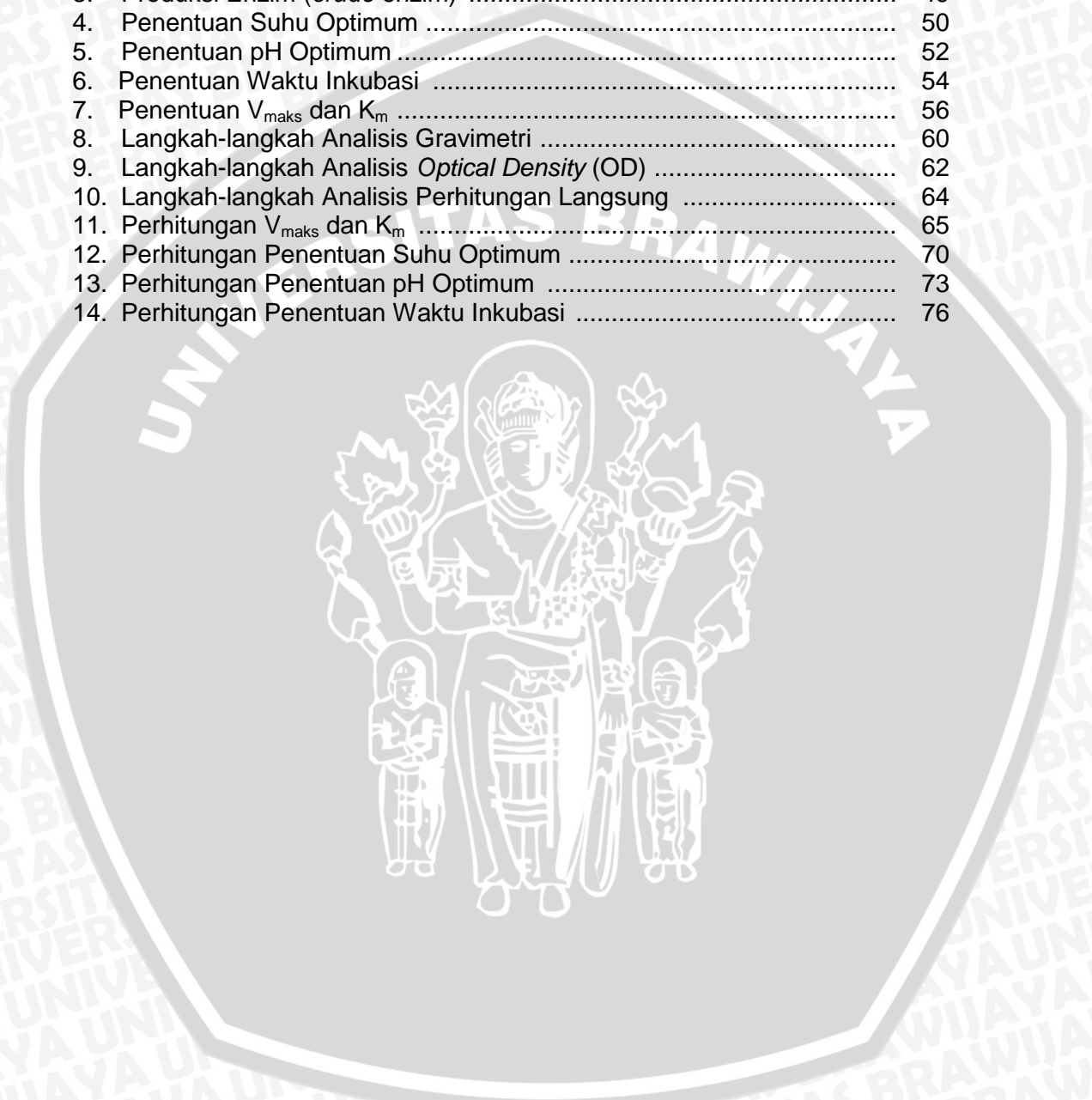
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Bacillus mycoides</i>	6
2. Skema Kerja Penelitian	28
3. Hasil Analisa Gravimetri Dengan Kertas Saring	30
4. Hasil Analisa Haemocytometer	31
5. Hasil Analisa Optical Density Dengan Spektrofotometer.....	32
6. Aktivitas Protease Pada Variasi Suhu	34
7. Aktivitas Protease Pada Variasi pH.....	36
8. Aktivitas Protease Pada Variasi Waktu Inkubasi	37
9. Penentuan V_{maks} dan K_m	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Kultur Stok Isolat	45
2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik	47
3. Produksi Enzim (<i>crude</i> enzim)	49
4. Penentuan Suhu Optimum	50
5. Penentuan pH Optimum	52
6. Penentuan Waktu Inkubasi	54
7. Penentuan V_{maks} dan K_m	56
8. Langkah-langkah Analisis Gravimetri	60
9. Langkah-langkah Analisis <i>Optical Density</i> (OD)	62
10. Langkah-langkah Analisis Perhitungan Langsung	64
11. Perhitungan V_{maks} dan K_m	65
12. Perhitungan Penentuan Suhu Optimum	70
13. Perhitungan Penentuan pH Optimum	73
14. Perhitungan Penentuan Waktu Inkubasi	76



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 dapat memberikan manfaat dibidang pangan, pengobatan, dan industri seperti kelompok *Bacillus sp.* (Wikipedia, 2012).

Species *Bacillus* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *Bacillus cereus* 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. Salah satu bakteri *Bacillus sp.* misalnya *Bacillus mycooides* (Susanti, 2003).

Bacillus mycooides termasuk bakteri gram positif banyak terdapat didalam tanah. Bersifat halofilik yang dapat tumbuh dilingkungan berkadar garam tinggi dan kebutuhan nutrisinya yang sederhana membuatnya memiliki potensi yang tinggi untuk dimanfaatkan. Bakteri halofilik biasanya terdapat dalam makanan yang diasinkan. Merupakan indikator pencemar yang menandakan terjadinya pembusukan yang terjadi karena adanya aktivitas enzimatik seperti amilase dan protease yang mendegradasi bahan makanan yang diasinkan (Ventosa dan Oren, 1995). Bakteri-bakteri halofilik diantaranya tergolong dalam jenis *Halobacterium*, *Halococcus*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Pediococcus* dan *Alcaligenes* (Fardiaz, 1992).

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). Bakteri halofilik mampu memproduksi senyawa yang berguna seperti enzim, salah satunya adalah enzim protease.

Protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. 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).

Setiap bakteri memiliki kemampuan dalam menggunakan enzim yang dimilikinya untuk degradasi karbohidrat, lemak, protein dan asam amino. 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 (Fardiaz, 1992).

Karakterisasi protease dapat dilakukan dengan adanya aktivitas enzimatik dan metabolisme atau penggunaan dari molekul organik biasanya menghasilkan produk yang dapat digunakan untuk karakterisasi bakteri (Fardiaz, 1992). Penelitian yang telah dilakukan oleh Apsari (2011), tentang isolasi, karakterisasi dan identifikasi bakteri proteolitik dengan sampel ikan kuniran dan jambal roti memiliki karakteristik morfologi koloni berbentuk bulat, tepi tidak rata, elevasi cembung, berwarna putih dan merupakan gram positif. Diduga sebagai golongan genus *Bacillus* sp. yaitu bakteri *Bacillus alvei*, *Bacillus subtilis* dan *Bacillus pumilus*.

Penelitian yang dilakukan oleh Andriyani (2009) menggunakan sampel ikan asin, didapatkan isolat bakteri halofilik yang berjumlah 28 isolat. Dua puluh delapan isolat tersebut merupakan anggota dari delapan genus yaitu genus *Pseudomonas*, *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Deleya*, *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Marinococcus* dan *Kurthia*.

Penelitian ini menggunakan isolat dari ikan teri asin. Ikan teri asin merupakan salah satu jenis makanan yang diolah dan diawetkan dengan menggunakan konsentrasi garam yang relatif tinggi sehingga optimal untuk pertumbuhan bakteri halofilik (Buckle, *et. al.*, 1987). Namun penelitian tentang karakterisasi aktivitas enzim dari bakteri halofilik yang tumbuh pada isolasi ikan teri asin masih belum banyak dilakukan di Indonesia. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

1.2 Rumusan Masalah

Penelitian tentang karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin belum banyak dilakukan oleh peneliti lain. Padahal bakteri jenis *Bacillus* memiliki manfaat yang sangat besar dalam bidang pangan dan industri. Keunggulan lain dari *Bacillus* ini mudah ditumbuhkan, tidak memerlukan substrat yang mahal serta tahan pada temperatur dan garam tinggi.

Mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Sumardi dan Lengkana (2009), tentang isolasi *Bacillus* penghasil protease dari saluran pencernaan ayam kampung teridentifikasi bakteri *Bacillus* sebagai penghasil protease dengan aktivitas yang tinggi. Semua bakteri mempunyai enzim proteinase di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai proteinase ekstraseluler. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil protease lainnya yang juga telah

dilakukan, antara lain oleh Fatimah tahun 2005, yaitu berasal dari saluran pencernaan ikan nila galur GIFT (*O. niloticus*). Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat yang didapat *Enterobakter sp.*, *Bacillus sp.* dan *Aeromonas sp.*

Dengan demikian golongan *Bacillus sp.* terutama *Bacillus mycooides* yang berasal dari isolasi ikan teri asin diharapkan dapat diketahui karakterisasi aktivitas enzim protease pada bahan pangan khususnya produk perikanan yang mudah mengalami kerusakan, maka rumusan masalah yang akan diuraikan dalam penelitian ini adalah bagaimanakah karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk mengetahui karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah sebagai informasi kepada akademika tentang pengujian karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin. serta sebagai sumber informasi bagi penelitian selanjutnya.

1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang. Pada bulan Desember 2011 sampai Februari 2012.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus mycooides*

Bacillus mycooides 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 mycooides* menghasilkan enzim yang mereduksi nitrat dan methylen blue. *Bacillus mycooides* 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).

Ciri-ciri fisiologi dari *Bacillus mycooides* antara lain: termasuk gram positif, katalase positif, bentuk batang, koloni tumbuh pada media NA dan SPA, berwarna kuning transparan, koloni bulat dengan bagian pinggir rata, diameter koloni berkisar dari 1-8 mm, permukaan koloni kusam dan biasanya ditemukan ditanah, dapat tumbuh pada media yang diberi 5% NaCl, tidak dapat tumbuh pada suhu 50°C, sitrat negatif, gas dalam glukosa negatif, glukosa positif dan dapat tumbuh pada kondisi aerobik dan anaerobik (Kusmana, *et. al.*, 2005). Gambar dari bakteri *Bacillus mycooides* dapat dilihat pada Gambar 1. Klasifikasi dari bakteri *Bacillus mycooides* menurut Holt (2000), sebagai berikut:

Kingdom : Bakteri
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Order : Bacillales
Famili : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus mycooides*



Gambar 1. *Bacillus mycooides* (Wikipedia, 2010)

Species *Bacillus* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *Bacillus cereus* 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 mycooides* dipakai sebagai organisme inang untuk studi DNA (Doi, et. al., 1992).

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

2.3 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 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.

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 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 mikroba, serta mempunyai peranan penting dalam metabolisme dan regulasi dalam sel (Fatimah, 2005).

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 sitrat, dan kalsium klorida untuk standar metode agar. Sensitifitasnya yang bertambah berhubungan dengan deteksi pada langkah awal pemecahan kasein, pembentukan areal endapan (para kasein tak terlarut) dalam media transparan (Downes dan Ito, 2001).

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

2.5 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.

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, 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

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+} , C1^- , 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 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 represisi enzim-enzim tertentu (Said, 1986).

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).

2.6.1 Analisa Gravimetri

Analisa gravimetri ini menggunakan metode kertas saring. Analisis Gravimetri 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 (Indra, 2008).

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 (Anonymous, 2011).

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 penyaringan (Fatimah, 2005).

2.6.2 Analisa Optical Density

Pertumbuhan sel dapat diukur dari massa sel dan secara tidak langsung dengan mengukur turbiditas cairan medium tumbuh. Massa sel dapat dipisahkan

dari cairan mediumnya menggunakan alat sentrifuse sehingga dapat diukur volume massa selnya atau diukur berat keringnya (dikeringkan dahulu dengan pemanasan pada suhu 90-110°C semalam). Umumnya berat kering bakteri adalah 10-20 % dari berat basahya (Schlegel, 1994).

Semakin banyak zat terlarut akan menyerap panjang gelombang tertentu lebih besar. Dengan demikian perbedaan serapan sinar menunjukkan intensitas zat terlarut yang diukur. Ada hubungan antara penyerapan sinar atau panjang gelombang tertentu dengan konsentrasi larutan. Besarnya sinar diserap larutan disebut *Optical Density* (OD) atau nilai absorbansi dan nilai *Optical Density* yang meningkat pada fase eksponensial disebabkan oleh sel bakteri yang melakukan pembelahan dengan maksimal (Lay, 1994).

Dalam spektrofotometer terdapat 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

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). 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, 2009).

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 enzimatik 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)

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.

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).

2.8 Penentuan K_m dan V_{maks}

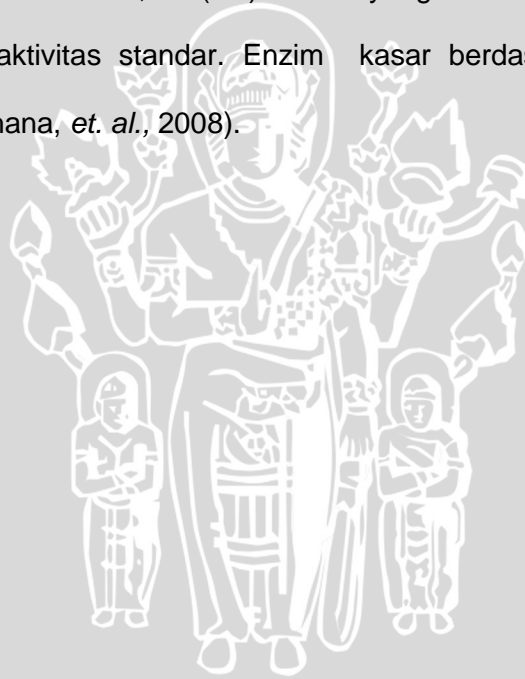
Dalam reaksi enzim dikenal kecepatan reaksi hidrolisis, penguraian atau reaksi katalisasi lain yang disebut velocity (V). Harga V dari suatu reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat (S), akan tetapi setelah (S) meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap

(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.

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 *plot 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 protease ini terdiri dari bakteri *Bacillus mycooides* didapatkan dari kultur stok dari penelitian sebelumnya. Aquadest, NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*) didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Kasein *Hammersten* (2% kasein dalam 0,05M larutan buffer fosfat pH 7,0), larutan TCA 5%, *tyrosin standart*, Na₂CO₃ 0,5M didapatkan dari Panadia *Laboratory*, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang. Kertas saring Whatman no. 42, pereaksi folin, Na₂CO₃ 0,5M, buffer fosfat 0,01M, HCl 0,05M, CaCl₂ 2 mmol/L, aluminium foil, alkohol 70% didapatkan dari CV. Makmur Sejati, Perumahan Griya Santha Blok I no. 238 Malang.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam karakterisasi bakteri proteolitik ini terdiri dari tabung reaksi merk Pyrex, rak tabung reaksi, pipet volume 10 mL merk Pyrex, pipet serologis merk Pyrex, bola hisap, erlenmeyer 50 mL merk Duran, 100 mL dan 250 mL merk Pyrex, gelas ukur 25 mL, 50 mL dan 100 mL merk Pyrex, beaker glass 100 mL dan 250 mL merk Pyrex, spatula, mikro tube merk Iwaki, autoklaf, timbangan digital merk Mettler Toledo, vortex mixer merk Barnstead, nampan, shaker incubator merk SI-600R, jarum loop, jarum ose, kompor, sprayer, mikropipet merk Avi-Teck, panci, bunsen, inkubator merk Memmert, sentrifuse merk Sartorius Sigma 3-18K, crushable tang, timbangan analitik merk Mettler Toledo, washing bottle, pH-meter merk Lutron YK-2001PH, spektrofotometer merk Thermo Spectronic, haemocytometer serta mikroskop merk Olympus.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif atau yang bersifat menjelajah. Artinya, penelitian dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Untuk mencapai tujuan utama yaitu mengetahui karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* isolasi dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin. 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

Pembuatan kultur stok bakteri *Bacillus mycooides* dengan menggunakan metode Downes dan Ito (2001), media yang digunakan adalah NA (*Nutrient Agar*) dan kasein sebanyak 5 mL, larutan tersebut dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dipanaskan supaya tercampur merata. Media NA kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media dikeluarkan dari autoklaf kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL, dibiarkan padat pada posisi miring dengan kemiringan $\pm 30^{\circ}$ agar luas permukaan media menjadi lebar. Media agar miring tersebut diinkubasi pada inkubator dengan suhu ruang yaitu 37⁰C selama 24 jam. Isolat bakteri *Bacillus mycooides* diambil 1 loop secara aseptis yang didapat dari penelitian sebelumnya

pada media NA dengan metode gores secara zig-zag. Kultur stok disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C . Langkah-langkah pembuatan kultur stok dapat dilihat pada Lampiran 1.

Isolat bakteri proteolitik yang didapatkan pada tiap tahap isolasi, karakteristik dan identifikasi isolat yang telah murni dikulturkan pada media *Nutrient Agar* (NA) miring dan disimpan dalam refrigerator -20°C . Peremajaan isolat dilakukan secara rutin tiap 2 minggu (Fatimah, 2005).

3.3.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Bacillus mycooides*

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus mycooides* menggunakan metode Kosim dan Putra (2009), dengan mengambil bakteri *Bacillus mycooides* sebanyak 1 ose dari stok biakan bakteri, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 mL larutan Na-fis 0,9%, dibandingkan dengan Mc. Farland ($10^{-5} = 1500 \times 10^6$ mL). Dalam hal ini, 1 mL Na-fis 0,9% yang ditambah bakteri *Bacillus mycooides* terlihat lebih keruh dari Mc. Farland sehingga ditambahkan lagi larutan Na-fis 0,9% sampai volumenya mencapai ± 3 mL. *Bacillus mycooides* dan larutan Na-fis 0,9% setelah tingkat sama dengan Mc. Farland, diambil 1mL sebagai starter dan dimasukkan ke dalam 100 mL media *Nutrient broth* (NB) yang mengandung 1 gr kasein. Media NB diinkubasi dalam *shaker incubator* pada kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 24 jam. Media NB yang didalamnya sudah terdapat starter bakteri selanjutnya diambil setiap 2 jam sekali, dengan 3 perhitungan yaitu: Gravitimetri dengan kertas saring, *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer panjang gelombang 660 nm, perhitungan langsung dengan Haemocytometer, kemudian hasil akhir dari penelitian dibuat kurva pertumbuhannya.

Pada pembuatan kurva ini digunakan 3 metode perhitungan yaitu: analisa gravimetri, dengan metode kertas saring, analisa *optical density* dengan metode spektrofotometer dan analisa perhitungan langsung dengan metode

haemocytometer. Langkah-langkah dalam pembuatan kurva pertumbuhan dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.2.1 Analisa Gravimetri

Perhitungan gravimetri dengan kertas saring dengan menggunakan metode Kosim dan Putra (2009), yaitu metode pengendapan. Prinsip dasar metode gravimetri yaitu untuk analisa kuantitatif didasarkan pada proses pengendapan, metode pengendapan gravimetri ini menggunakan pereaksi yang akan menghasilkan endapan dengan zat yang dianalisa sehingga mudah dipisahkan dengan cara penyaringan.

Cara kerja analisa gravimetri menggunakan kertas saring Whatman no. 42 yang sudah dikeringkan terlebih dahulu dan dihitung sebagai berat awal. Media *Nutrient broth* (NB) dan bakteri yang telah di *shaker incubator* lalu diambil 5 mL kemudian 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.

3.3.2.2 Analisa Optical Density (OD)

Perhitungan *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer panjang gelombang 660 nm dengan menggunakan metode Kosim dan Putra (2009), yaitu metode ini untuk menentukan konsentrasi senyawa-senyawa yang menyerap radiasi pada sinar UV. Langkah awal yang dilakukan yaitu hasil dari *shaker inkubator* pada pencampuran bakteri *Bacillus mycoides* dengan media *Nutrient broth* (NB), diambil sebanyak 3 mL ditaruh dalam kuvet dan didiamkan selama 5 menit, kemudian dihitung nilai absorbansinya dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

Analisa optical density ini menggunakan metode spektrofotometer. Salah satu contoh instrumentasi analisis yang lebih kompleks adalah spektrofotometer. Langkah-langkah analisa *optical density* (OD) dapat dilihat pada Lampiran 9.

3.3.2.3 Analisa Perhitungan Langsung

Perhitungan langsung dengan menggunakan metode haemocytometer dengan menggunakan metode Kosim dan Putra (2009). Pada metode ini menghitung secara langsung dengan menghitung secara langsung, tahap awal yang dilakukan adalah hasil dari media *Nutrient broth* (NB) dengan bakteri *Bacillus mycooides* setelah di *shaker*, diambil sebanyak 1 mL dengan menggunakan mikropipet, didiamkan beberapa saat sampai media merata. Kemudian dihitung dengan menggunakan alat yaitu *Haemocytometer* atau *hauser chamber* dengan bantuan mikroskop. Langkah-langkah analisa perhitungan langsung dapat dilihat pada Lampiran 10.

3.3.3 Produksi Enzim (*crude* enzim)

Dengan menggunakan metode Sumardi dan Lengkana (2009), produksi enzim dapat dilakukan dengan cara mengisolat bakteri proteolitik yang telah didapatkan dari fase log yang dilihat pada kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus mycooides* selama 24 jam. Kultur fermentasi berupa media *Nutrient broth* (NB) 250 mL diberi starter sebanyak 2,5 mL, diinkubasi dalam *shaker incubator* selama \pm 10 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm. Media NB dan starter kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no. 42 dan diambil substratnya, diinkubasi selama 24 jam pada inkubator suhu 37°C. Substrat bakteri *Bacillus mycooides* disentrifuse dengan kecepatan 15.000 rpm pada suhu 4°C sehingga terbentuk cairan supernatan enzim. Supernatan enzim yang diperoleh 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

Pengujian aktivitas protease menurut metode Walter (1984) dengan menggunakan spektrofotometer. Buffer fosphat 0,01 M sebanyak 0,5 mL

dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing blanko, standar, sampel kemudian ditambahkan substrat kasein 20 mg/mL sebanyak 0,5 mL. Tabung reaksi sampel ditambahkan enzim sebanyak 0,1 mL. Tabung reaksi standar ditambahkan tirosin standar 5 $\mu\text{mol/mL}$. Tabung reaksi blanko ditambahkan akuades sebanyak 0,1 mL. Ketiga tabung di *vorteks* dan diinkubasi di *shaker incubator* selama 10 menit dengan suhu 37 $^{\circ}\text{C}$, setelah waktu inkubasi ditambahkan TCA 5% pada semua tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mL. Tabung reaksi sampel dimasukkan akuades sebanyak 0,1 mL dan pada tabung reaksi blanko dan standar ditambahkan enzim masing-masing sebanyak 0,1 mL. Ketiga tabung di *vorteks* dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 10 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. Masa inkubasi selesai, ketiga tabung reaksi disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Dari ketiga tabung reaksi masing-masing filtrat diambil sebanyak 0,75 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi yang baru. Filtrat yang baru dipindahkan, ditambahkan dengan Na_2CO_3 masing-masing sebanyak 2,5 mL. Ketiga filtrat ditambahkan fenol folin masing-masing sebanyak 0,5 mL. Ketiga tabung reaksi di *vorteks* dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

Perhitungan aktivitas enzim 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 Suhu Optimum Enzim Protease

Penentuan suhu optimum enzim protease menggunakan metode Walter (1984), menggunakan variasi suhu 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C. Dari beberapa suhu tersebut diambil variasi suhu mulai dari minimum sampai maksimum yaitu 20°C, 40°C, 60°C dan 80°C. Langkah-langkah penentuan suhu optimum enzim protease dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.3.4.2 Penentuan pH Optimum Enzim Protease

Penentuan pH optimum enzim protease menggunakan metode Walter (1984), 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. Dari beberapa pH tersebut diambil variasi pH pada kisaran pH 7,0 yaitu antara pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, dan pH 9. Langkah-langkah penentuan pH optimum enzim protease dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.3.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Enzim Protease

Penentuan waktu inkubasi enzim protease menggunakan metode Walter (1984), menggunakan rentang waktu antara 4 jam, 8 jam, 12 jam dan 16 jam. Pada waktu inkubasi dilihat waktu yang menunjukkan aktivitas enzim yang paling optimum. Langkah-langkah penentuan waktu inkubasi enzim protease dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.3.4.4 Penentuan V_{maks} dan K_m (Penentuan Michaelis-Menten)

Penentuan V_{maks} dan K_m menggunakan metode Walter (1984), prinsip penentuan K_m dan V_{maks} adalah kecepatan maksimal enzim bereaksi dapat mendekati kecepatan V_{maks} tetapi tidak akan pernah mencapainya pada persamaan Michaelis-Menten konstan, sama dengan konsentrasi di mana laju proses sama dengan setengah dari tingkat maksimum. Penentuannya menggunakan reaksi larutan *folin-phenol ciocalteu* dengan sampel dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm. Penentuan Nilai V_{maks} dan K_m

ditentukan dari grafik *plot Lineweaver-Burk* laju reaksi enzim (maksimum) terhadap konsentrasi substrat. Langkah-langkah penentuan V_{maks} dan K_m dapat dilihat pada Lampiran 7.

Prosedur kerja penentuan nilai V_{maks} dan K_m dengan membuat tiga larutan yang berbeda, yaitu larutan sampel, larutan blanko dan larutan standar. Ketiga larutan ini dibuat untuk kontrol pada saat penelitian. Pembuatan larutan sampel, larutan blanko dan larutan standar dapat dilihat dibawah ini:

Pembuatan larutan sampel menggunakan kasein dengan konsentrasi 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 dan 1,25% (w/v) dicampurkan kedalam 1 mL buffer fosfat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCl 0,05 mol/L dan 0,2 mL larutan enzim protease. Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 2 mL TCA dan 0,2 mL $CaCl_2$ 2 mmol/L, didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C. Larutan sampel disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, diambil supernatan sebanyak 1,5 mL, ditambahkan 5 mL Na_2CO_3 dan 1 mL pereaksi *folin-phenol* ciocalteu, didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm.

Pembuatan larutan blanko menggunakan buffer fosfat sebanyak 1 mL, 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. Larutan blanko setelah 10 menit ditambahkan 2 mL TCA 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. Supernatan sebanyak 1,5 mL dicampur dengan 5 mL Na_2CO_3 dan 1 mL pereaksi *folin-phenol* ciocalteu. Larutan blanko didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm.

Pembuatan larutan standar menggunakan buffer fosfat sebanyak 1 mL, 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. Larutan standar setelah 10 menit ditambahkan 2 mL TCA 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. Supernatan sebanyak 1,5 mL dicampur dengan 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL pereaksi *folin-phenol* ciocalteu. Larutan standar didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C, dan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

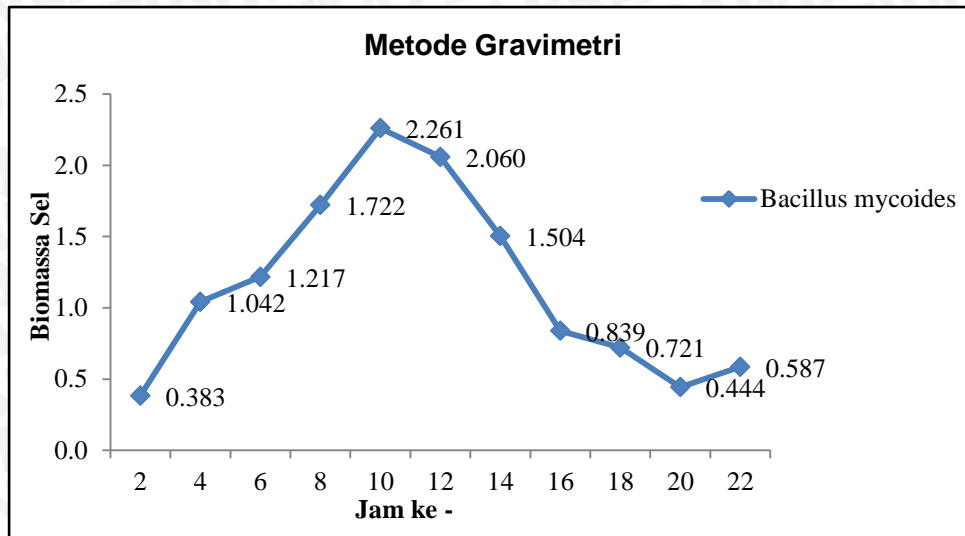
4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Bakteri *Bacillus mycooides* yang digunakan dalam produksi enzim adalah pada saat fase log. Oleh karena itu diperlukan data untuk mengetahui fase pertumbuhan dari bakteri tersebut melalui data kurva pertumbuhannya. Data kurva pertumbuhan dibuat dengan biakan pada media padat, kemudian bakteri diinokulasi pada media cair yang digunakan sebagai kultur awal. Kultur awal media cair ini bertujuan untuk menyeragamkan usia bakteri dari biakan padat.

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri proteolitik ini menggunakan metode Kosim dan Putra (2009), yaitu dengan tiga metode yang berdeda, antara lain dengan metode gravimetri, metode hitung langsung dan metode *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Tujuan dari pembuatan kurva dengan tiga metode yang berbeda ini adalah untuk membandingkan dan mencari hasil yang terbaik berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut, sehingga selanjutnya akan dilakukan isolasi protease dari fase log bakteri *Bacillus mycooides*.

4.1.1 Kurva Pertumbuhan (Metode Gravimetri)

Dalam analisa gravimetri yang dihitung adalah bagian berat dari zat yang dianalisa yang terdapat dalam sampel. Pada analisa gravimetri ini menggunakan gravimetri cara penguapan untuk mengetahui berat biomassa sel bakteri *Bacillus mycooides*. Pada proses penguapan kertas saring yang berisi biomassa sel menggunakan oven dengan suhu 80°C agar hasil yang didapat maksimum dan bisa menguap dengan sempurna pada permukaan kertas saring. Berdasarkan analisis biomassa sel menggunakan metode gravimetri, dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Analisa Gravimetri Dengan Kertas Saring

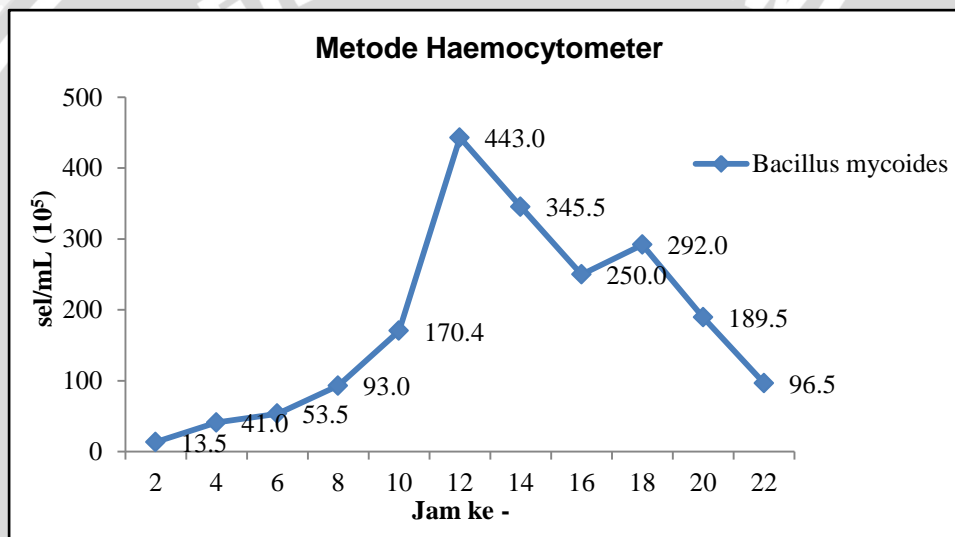
Dari kurva pertumbuhan *Bacillus mycooides* pada Gambar 3, dapat dilihat bahwa *Bacillus mycooides* melakukan adaptasi sampai fase log selama ± 6 jam. Waktu adaptasi ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan media *starter* untuk pertumbuhan awal bakteri lebih sedikit dari pada media produksi, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen.

Setelah mengalami fase adaptasi, maka bakteri akan memasuki fase log. Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya. Pada fase ini bakteri banyak memproduksi zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya. Pada penelitian ini, fase log bakteri terjadi pada jam ke-6 hingga jam ke-8 dengan biomassa sel sebesar 2,261 sel/mL. Setelah fase log berakhir, pada jam-10 mulai berkurang dan bahkan tidak ada pertumbuhan sama sekali sampai jam-22 hingga akhirnya berada pada fase kematian. Sama halnya penelitian yang dilakukan oleh Susanti (2003), menunjukkan fase log pada jam ke-6 sampai jam ke-8 dengan menggunakan sampel bakteri *Bacillus subtilis* yang didapat dari

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi Unair Surabaya tetapi pengujiannya menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 600 nm.

4.1.2 Kurva Pertumbuhan (Metode Hitung Langsung)

Jumlah bakteri dapat dihitung secara langsung maupun tidak 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*. Data hasil analisa menggunakan metode hitung langsung dengan Haemocytometer dapat dilihat pada Gambar 4.

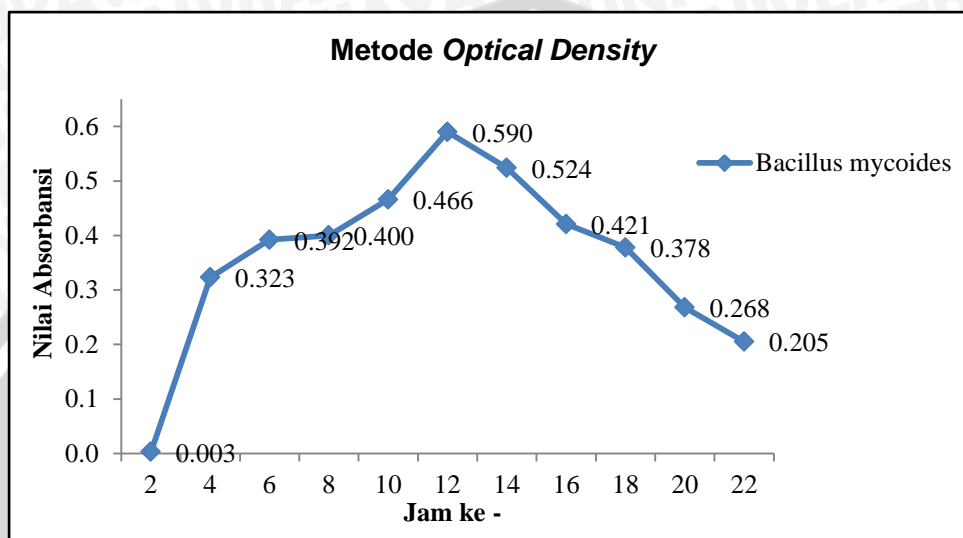


Gambar 4. Hasil Analisa Haemocytometer

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus mycooides* pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa *Bacillus mycooides* melakukan fase pertumbuhan pada jam ke-0 sampai jam ke-6, kemudian fase adaptasi pada jam ke-6 hingga jam ke-10. Setelah mengalami fase adaptasi, maka bakteri akan memasuki fase log. Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya. Pada penelitian ini, fase log bakteri terjadi pada jam ke-10 hingga jam ke-12 dengan jumlah bakteri 443×10^5 sel/mL.

4.1.3 Kurva Pertumbuhan (Metode *Optical Density*)

Data hasil penelitian analisa menggunakan Spektrofotometer dengan metode Turbidimetri (*Optical Density*) pada panjang gelombang 660 nm dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Analisa *Optical Density* Dengan Spektrofotometer

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus mycoides* pada Gambar 5, dapat dilihat bahwa *Bacillus mycoides* melakukan adaptasi hingga fase lag dari jam ke-6 sampai jam ke-10 dapat dikatakan cukup lama. Hal ini dikarenakan media starter untuk pertumbuhan awal bakteri lebih sedikit dari pada media produksi, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen.

Setelah mengalami fase adaptasi, maka bakteri akan memasuki fase log. Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya. Pada penelitian ini, fase log bakteri terjadi pada jam ke-10 hingga jam ke-12 dengan nilai absorbansi 0,590.

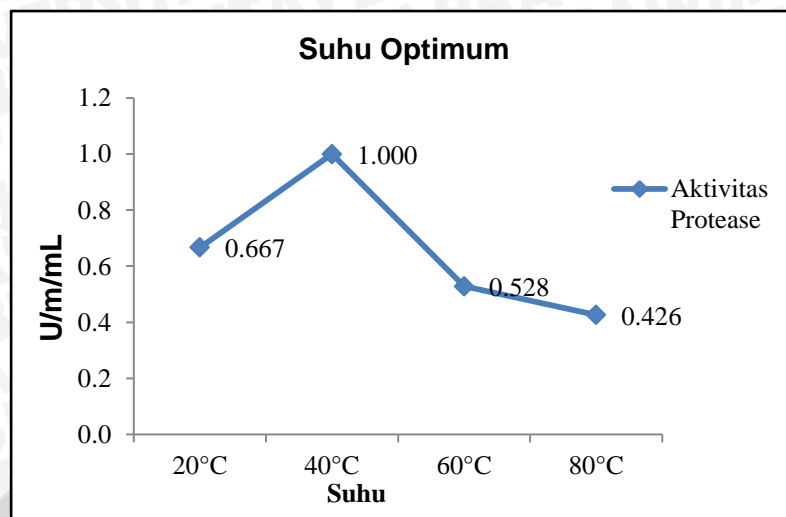
Pengamatan terhadap kurva pertumbuhan juga telah dilakukan oleh Kosim dan Putra (2009), dimana fase log dimulai pada jam ke-5 hingga jam ke-13. Dikarenakan medium yang digunakan oleh Kosim dan Putra berbeda

dengan medium yang digunakan pada penelitian ini. Selain itu juga, panjang gelombang yang digunakan pada pengamatan Kosim dan Putra pada panjang gelombang 600 nm sedangkan pada penelitian ini menggunakan panjang gelombang 660 nm sehingga densitas optik yang dihasilkan akan berbeda pula. Perbedaan ini dapat dilihat pada data densitas optik pada Gambar 5. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Nugroho (2006), fase log *Bacillus sp.* Terjadi pada jam ke-48. Perbedaan hasil ini diduga disebabkan dari media pertumbuhan yang berbeda dimana pada penelitian yang dilakukan oleh Nugroho menggunakan media SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1% dan parafin cair 1%.

Hasil penelitian pada pembuatan kurva pertumbuhan bakteri protease didapatkan hasil yang berbeda. Pada metode Gravimetri didapat fase log pada jam ke-8, hal ini dikarenakan pada saat penelitian kertas saring yang digunakan kurang dan menggunakan kertas saring dengan merk berbeda sehingga menyebabkan berat dari kertas saring dan sampel berbeda pula. Berbeda dengan metode Haemocytometer dan metode *Optical Density* didapat fase log pada jam ke-12. Dari ketiga metode di atas didapatkan hasil terbaik dengan menggunakan metode *Optical Density* dengan panjang gelombang 660 nm, disebabkan pada metode ini menggunakan alat spektrofotometer sehingga dapat meminimalisir kesalahan pada saat penelitian. Untuk mendapatkan aktivitas protease terbaik, bakteri *Bacillus mycoides* ditumbuhkan sampai jam ke-12 pada saat pertumbuhan maksimal atau pada fase log.

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 dan 80°C dengan 2 kali pengulangan. Data hasil analisa perlakuan suhu dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Aktivitas Protease Pada Variasi Suhu

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan didapatkan aktivitas enzim pada suhu 20°C cukup kecil karena suhu yang terlalu rendah. Aktivitas enzim optimum pada suhu 40°C sebesar 1,000 Unit/m/mL. Bakteri *Bacillus mycooides* ini mampu menghasilkan enzim protease dengan maksimum pada suhu 40°C, sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri ini merupakan bakteri termofilik yang mampu tumbuh pada suhu 40°C - 70°C. Hal yang sama ditunjukkan oleh Sumardi dan Lengkana (2009), dengan menggunakan bakteri *Bacillus* yang diisolasi dari saluran pencernaan ayam kampung didapatkan suhu optimum tertinggi pada suhu 40°C sebesar 0,091 U/mg dengan substrat media *skim milk* agar dan menggunakan metode yang sama yaitu metode Walter (1984).

Pengamatan terhadap suhu optimum bakteri protease yang telah dilakukan oleh Grata, *et. al.*, (2003) menunjukkan hasil yang berbeda tetapi masih menggunakan bakteri yang sama yaitu *Bacillus mycooides*. Hasil penelitian menunjukkan nilai aktivitas protease tertinggi pada perlakuan suhu 60°C sebesar 11,44 μ mol dengan menggunakan media kasein. Walaupun menggunakan bakteri yang sama yaitu *Bacillus mycooides* didapatkan hasil yang berbeda diduga karena Grata menggunakan metode Horikoshi dan pembacaan spektrofotometer dengan panjang gelombang 275 nm, merupakan panjang gelombang maksimum

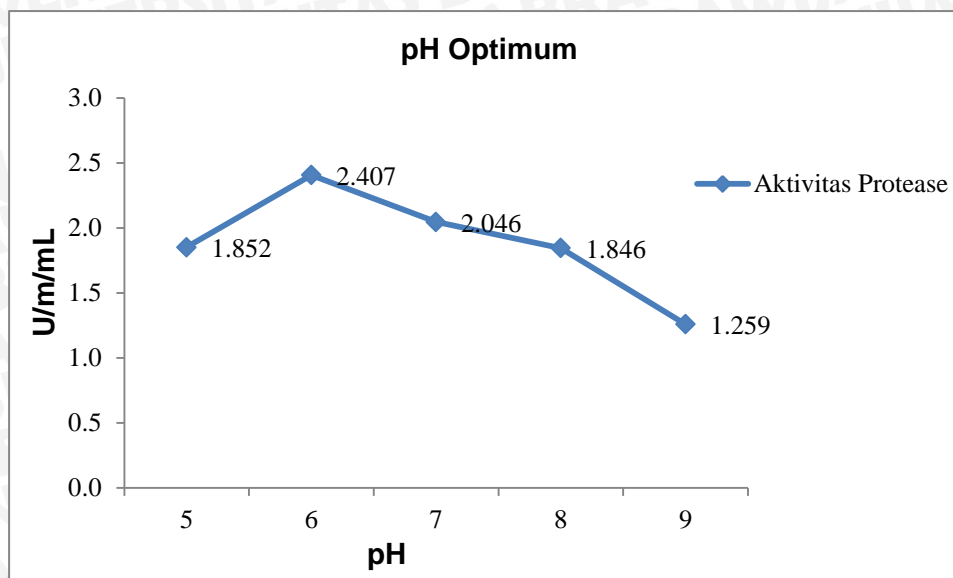
untuk penyerapan sinar UV oleh protein yang mengandung residu asam amino aromatik (misalnya tirosin dan triptopan). Perhitungan aktivitas enzim pada perlakuan suhu dapat dilihat pada Lampiran 12.

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 merusak enzim.

Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Hal ini disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim Putra dan Kosim (2009).

4.3 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan pH

Analisa yang dilakukan pada perlakuan pH ini menggunakan lima pH yang berbeda antara kisaran pH 7,0 yaitu pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9 dengan 2 kali pengulangan. Data hasil analisa perlakuan suhu dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Aktivitas Protease Pada Variasi pH

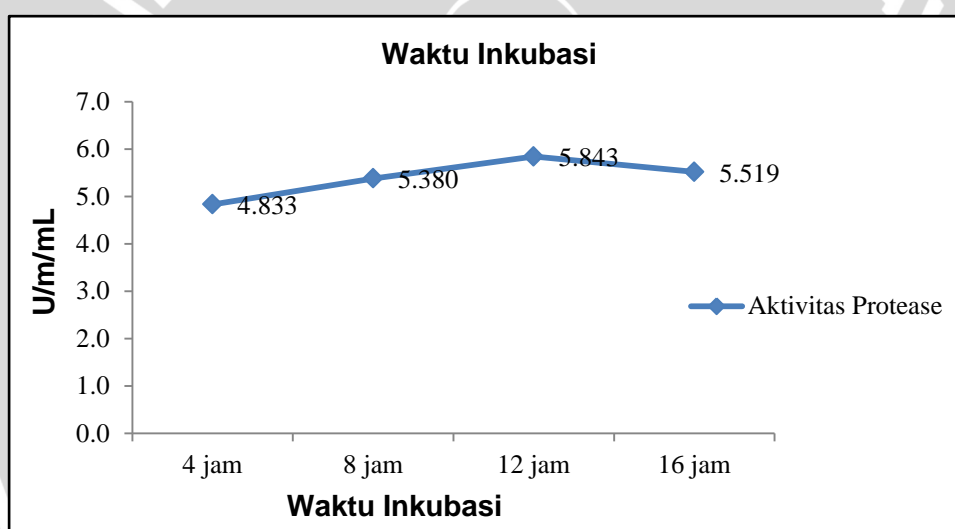
Dari hasil pengamatan didapatkan aktivitas enzim terendah pada pH 9 sebesar 1,259 U/m/mL. Aktivitas enzim tertinggi pada pH 6 sebesar 2,407 Unit/m/mL. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Sumarlin (2010), didapatkan aktivitas protease dari bakteri *Bacillus circulans* pada pH 9. Perbedaan pH maksimum ini diduga karena berbeda spesies dan media menggunakan air rendaman kedelai yang memiliki kandungan protein cukup tinggi sebagai sumber nitrogen bagi mikroorganisme. Bakteri *Bacillus mycoides* mampu memproduksi enzim dengan maksimal pada pH 6 yang bersifat asam. pH mempengaruhi aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh isolat. Aktivitas optimum enzim protease berada pada pH 6,0. Aktivitas protease isolat terlihat meningkat mulai dari pH 5,0 – pH 6,0 dan aktivitas protease mulai menurun pada pH 7,0 – pH 9,0. Perhitungan aktivitas enzim pada perlakuan pH 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 2 kali pengulangan. Data hasil analisa perlakuan suhu dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Aktivitas Protease Pada Variasi Waktu Inkubasi

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan didapatkan aktivitas enzim optimum pada waktu inkubasi selama 12 jam yaitu sebesar 5,843 Unit/m/mL. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Susanti (2002), yang melakukan pengamatan terhadap waktu inkubasi protease bakteri *Bacillus sp.* BAC4 dan *Bacillus subtilis* selama 8 jam. Perbedaan waktu inkubasi ini diduga karena perbedaan media pertumbuhan yang digunakan yaitu media LB (*Luria Bertani*) tetapi tetap menggunakan substrat kasein. Bakteri *Bacillus mycoides* ini mampu menghasilkan enzim protease dengan maksimum pada waktu inkubasi 12 jam

karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah bertimbun dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya. Pada fase ini sel mengeluarkan metabolit yang sebagian besar digunakan untuk mempertahankan diri (Peleczar dan Chan, 1986). Perhitungan aktivitas enzim pada variasi waktu inkubasi dapat dilihat pada Lampiran 14.

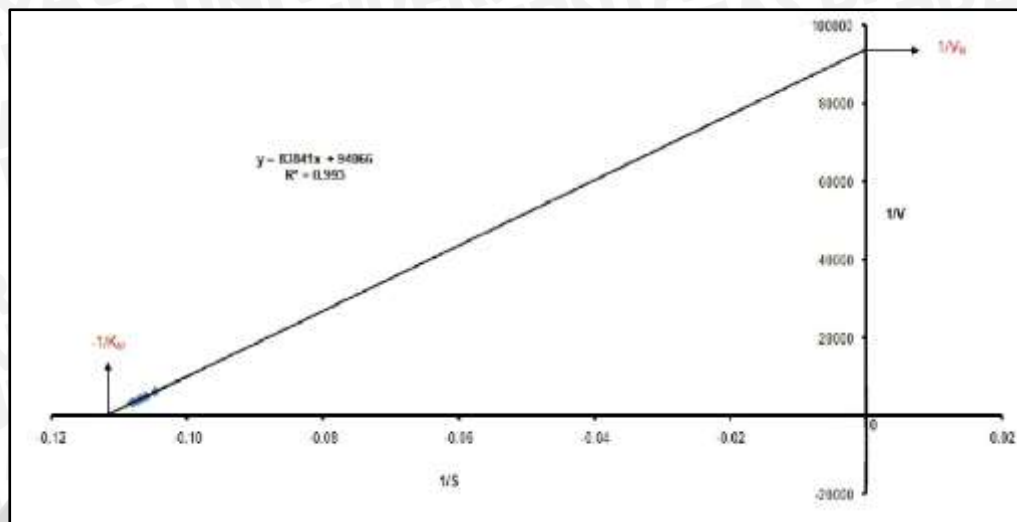
Aktivitas protease dengan perlakuan waktu inkubasi cenderung mengalami peningkatan seiring semakin lama waktu inkubasi yang digunakan, hal ini disebabkan pertumbuhan bakteri mengalami perkembangan cepat maka aktivitas tertinggi tersebut selama 12 jam. Sintesis enzim-enzim ekstraseluler biasanya mengikuti salah satu dari dua pola umum yang ada. Pada pola yang pertama yaitu sintesa dan sekresi enzim ekstraseluler meningkat seiring dengan pertumbuhan sel (fase ekponensial) dan mengalami penurunan pada waktu sel mencapai fase stasioner. Pola yang kedua yaitu enzim ekstraseluler disintesa dengan kecepatan minimal selama fase ekponensial dan selanjutnya akumulasi enzim terjadi pada fase stasioner (Widhyastusi, *et. al.*, 2002).

Dalam beberapa hal, produksi enzim juga sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, misalnya pola sintesa dari sekresi protease oleh *Bacillus megaterium*. Dalam minimal medium pola sintesa dan sekresi protease oleh *B. megaterium* mengikuti pola yang pertama akan tetapi dalam media yang mengandung nitrogen kompleks sintesa dan sekresi protease mengikuti pola yang kedua (Fahmi, 2000).

4.5 Penentuan V_{maks} dan K_m

Nilai V_{maks} dan K_m suatu enzim sangat menentukan pembentukan kompleks antara enzim dan substrat, sehingga proses konversi substrat menjadi produk dapat berlangsung. Penentuan Nilai V_{maks} dan K_m ditentukan dari grafik

plot *Lineweaver-Burk* laju reaksi enzim (maksimum) terhadap konsentrasi substrat. Grafik dari penentuan V_{maks} dan K_m dapat dilihat pada Gambar 9.

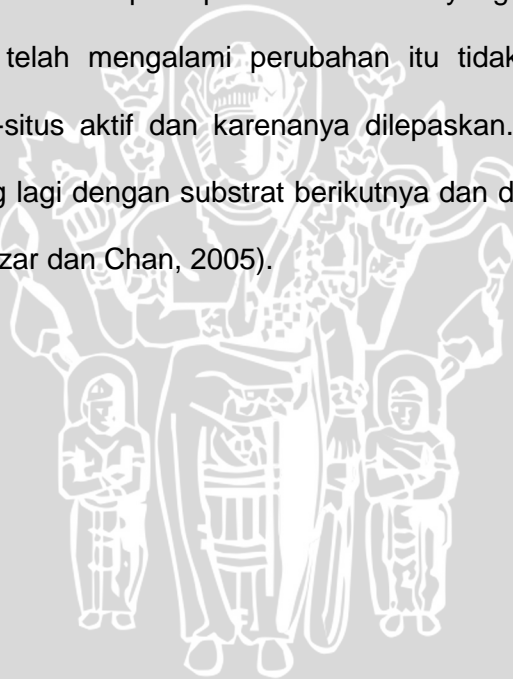


Gambar 9. Penentuan V_{maks} dan K_m

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai V_{maks} dan K_m pada aktivitas protease bakteri *Bacillus mycooides* dengan menggunakan substrat kasein dengan nilai V_{maks} sebesar $0,0106 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ dan K_m sebesar $0,8912998 \times 10^3 \text{ mM}$. Nilai ini dapat menjelaskan bahwa pada kelajuan maksimum ($V_{\text{max}} = 0,0106 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), semua sisi aktif enzim akan berikatan dengan substrat, dan jumlah kompleks E-S (Enzim Substrat) sama dengan jumlah total enzim yang ada. Sedangkan jumlah substrat yang diperlukan untuk mencapai nilai kelajuan reaksi tertentu diekspresikan oleh konstanta Michaelis-Menten (K_m), yang merupakan konsentrasi substrat yang diperlukan oleh suatu enzim untuk mencapai setengah kelajuan maksimumnya. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Ellis (2001), nilai K_m yang didapat sebesar $7,187 \times 10^3 \text{ mM}$ dimana nilai ini dapat menunjukkan seberapa kuatnya pengikatan substrat ke enzim. Perbedaan ini diduga karena substrat yang berbeda pada saat penelitian yang menggunakan substrat ikan peperek. Perhitungan penentuan nilai konstanta Michaelis-Menten K_m dan V_{maks} dapat dilihat pada Lampiran 11.

Nilai kecepatan reaksi maksimum (V_{maks}) yang diperoleh rendah sedangkan nilai K_m tinggi bila dibandingkan dengan penelitian Putranto (2006) yaitu pada *Lactobacillus* yang memiliki V_{maks} sebesar 28,6 mM min⁻¹ dan K_m sebesar 0,25 mg/mL. Diduga hal ini disebabkan karena protease *Lactobacillus* yang digunakan belum dilakukan pemurnian. Kinetika reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh kemurnian substrat. Apabila substrat tidak murni, maka kinetika enzimatik akan berjalan lamban atau terhambat (Ketaren, 1990).

Aktivasi memungkinkan substrat diubah oleh kerja enzim. Terjadinya aktivasi molekul substrat ini disebabkan oleh afinitas kimiawi substrat yang tinggi terhadap daerah-daerah tertentu pada permukaan enzim yang disebut situs aktif. Molekul-molekul yang telah mengalami perubahan itu tidak lagi mempunyai afinitas terhadap situs-situs aktif dan karenanya dilepaskan. Enzim kemudian bebas untuk bergabung lagi dengan substrat berikutnya dan demikianlah proses tersebut berulang (Pelczar dan Chan, 2005).



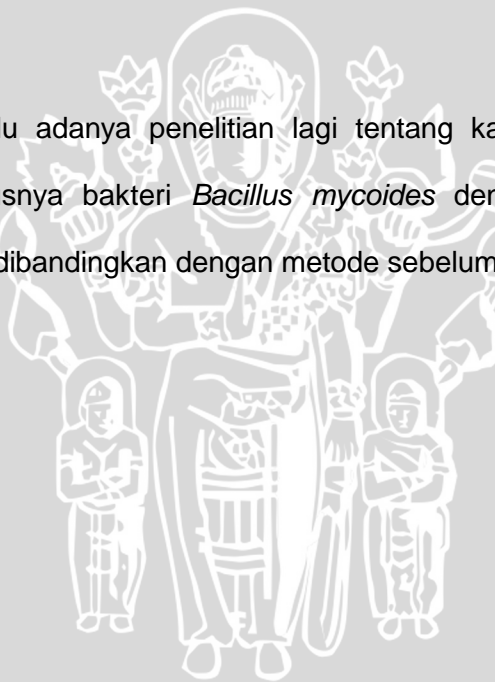
5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus mycoides* isolat dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin memiliki fase log pada jam ke-12 sebesar 0,590. Suhu optimum enzim protease pada suhu 40°C sebesar 1,000 U/menit/mL, pH optimum pada pH 6 sebesar 2,407 U/menit/mL, pada waktu inkubasi selama 12 jam sebesar 5,843 U/menit/mL serta mempunyai nilai V_{maks} sebesar 0,0106 mM $L^{-1} min^{-1}$ dan nilai K_m sebesar $0,8912998 \times 10^3$ mM.

5.2 Saran

Disarankan perlu adanya penelitian lagi tentang karakteristik aktivitas enzim protease khususnya bakteri *Bacillus mycoides* dengan metode yang berbeda supaya dapat dibandingkan dengan metode sebelumnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1989. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Kanisius. Yogyakarta
- Andriyani, D. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Halofilik dari Ikan Asin*. <http://google.com/halofilik/lkanAsin.php>. Diakses 30 Agustus 2009.
- Anisa, S., M Asya'ri., dan N.S. Mulyani. 2009. *Pengaruh Garam Monovalen (NaCl dan KCl) dan Divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Isolat Bittern Tambak Garam Madura*. Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia - Universitas Diponegoro. Semarang.
- Anonymous, 2010. *Inventarisasi dan Pemetaan Jenis Pengolahan Hasil Perikanan di Seluruh Indonesia*. Direktorat Jendral Perikanan. Balai Penelitian dan Pengujian Hasil perikanan. Jakarta. Diakses 23 Mei 2010.
- _____, 2011. *Bakteri Proteolitik*. [http://wikipedia.id/bahasaIndonesia/ensiklopedia/Bakteri Proteolitik/baca/halaman/komunikasi](http://wikipedia.id/bahasaIndonesia/ensiklopedia/Bakteri%20Proteolitik/baca/halaman/komunikasi). Wikipedia Bl. Diakses 17 September 2011.
- Apsari, A.A.W. 2011. *Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Proteolitik Berdaya Kuat dari Ikan Kuniran (Upeneus Sulphureus) dan Jambal Roti Manyung (Arius Thallasinus) Asin Berformalin*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas brawijaya. Malang
- Balqis, U. 2007. *Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Ekskretori/Sekretori Stadium L3 Ascaridia galli dan Pengaruhnya terhadap Pertahanan dan Gambaran Histopatologi Usus Halus Ayam Petelur*. IPB. Bogor.
- Boyer, H. W., and Carlton. B.C. 1971. *Production of Two Proteolytic Enzymes by A Transformable Strain of Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. Biophys. 128:442-455.
- Choliq, Abdul. 2008. *Aktivitas Enzim Protease dari Mucor javanicus yang Ditumbuhkan pada Media Tepung Singkong (Mannihot utilissima)*. Pusat Penelitian Biologi - LIPI. Cibinong.
- Djarajah, A. S. 2004. *Ikan Asin*. Kanisius. Yogyakarta.
- Doi, R.H. and M. Martina. 1992. *Biology of Bacillus*. Stoneham: Butterworth - Heinemann. Stoneham.
- Downes, F.P. and K. Ito. 2001. *Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Food*. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Ellis, M. B. 2001. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB International England. United Kingdom

- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. PT. Grafindo Persada. Jakarta.
- . 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT. Raja Grafindo Pustaka. Jakarta.
- Fatimah, I. 2005. *Isolasi Bakteri Proteolitik dari Pencernaan Ikan Nila Galur Gift (Oreochromis niloticus (Linnaeus) Trewavas) dan Karakterisasi Protease Ekstraselulernya*. Departemen Biologi. FMIPA - IPB. Bogor.
- Grata, K., Nabrdalik, M., Latala, A 2010. *Evaluation of Proteolytic Activity of Bacillus mycoides Stains*. Proceedings of ECOpole. Independent Department of Biotechnology and Molecular Biology. University of Opole. Vol 4, No. 2.
- Hartiningsih, I. Widiyono, H. Wuryastuty, H. Purnamaningsih. 2005. *Pengaruh Pemberian Teri Asin Terhadap Ekskresi Kalsium Urin dan Mineralisasi Tulang Femur Tikus Penderita Osteodistrofia Fibrosa*. Jurnal Sain Vet. Vol 23 No. 2 Th. 2005. Hal 87-92.
- 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.
- Hidayat, N., M.C. Padaga dan S. Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Andi. Yogyakarta
- Hurrigan. W.F and E. Margaret. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press. San Francisco.
- 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.
- Kurniati, Y.S. 2006. *Seleksi Mikroba Penghasil Enzim Hidrolase Ekstraseluler dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung*. Skripsi: FMIPA Unila. Bandar Lampung.
- Kusmana, C., I. Hilwan, P. Pamugkas, S. Wiboo, T. Tiryana, A. Triswanto, Yunasfi dan Hamzah. 2005. *Teknik Rehabilitasi Mangrove*. Fakultas Kehutanan Intsitut Pertanian Bogor. Bogor.
- 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*. Penerbit Swadaya. Jakarta

- Marcy. J.A., dan W.P. Pruett. 2001. *Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Food*. American Public Health Association. Washington, D. C.
- Muchtadi, D., Palupi, N.S., dan M. Astawan. 1992. *Enzim dalam Industri Pangan*. Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Naiola, E. dan Nunuk. W. 2002. *Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi protease dari Beberapa Isolat Bakteri*. Bidang Mikrobiologi. LIPI. Bogor
- _____. 2007. *Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease Bacillus spp*. Berk. Penel. Hayati. 13: 51-56.
- Nontji, A. 1987. *Laut Nusantara*. Penerbit Djambatan. Jakarta.
- Panji, S., Paulus, S. dan Fauzi. 2002. *Produksi dan Stabilisasi Desaturase dari Absidia corymbifera*. Majalah Menara Perkebunan.
- Pakpahan, Rosliana. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara*. Tesis. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Palaniswamy. M., M. K. Devi, A. R. Banu, G. R. Gnanaprabhal and B. V. Pradeep. 2008. *Purification, Characterization of Alkaline Protease Enzyme From Native Isolate Aspergillus niger and its Compatibility With Commercial Detergents*. Department of Microbiology. Karpagam University. Coimbatore 641 021. Tamil Nadu. India. Indian Journal of Science and Technology. Vol. 1. No. 7
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Pradani, Aida dan Hariastuti, Evi Muftiviani. 2009. *Pemanfaatan Fraksi Cair Isolat Pati Ketela Pohon Sebagai Media Fermentasi Pengganti Air Tajin pada Pembuatan Sayur Asin*. Universitas Diponegoro. Semarang
- Pratiwi, S. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta
- Putranto, Wendry Setiyadi. 2006. *Purifikasi dan Karakterisasi Protease Yang Dihasilkan Lactobacillus acidophilus dalam Fermentasi Susu Sapi Perah*. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Bandung. Vol.4. No.2.
- 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.
- Rosenawati, D. 1996. *Isolasi Khamir Penghidrolisis Pati Segar dari Bahan Ubi Kayu*. Skripsi: FMIPA - Unila. Bandar Lampung.
- Seeley jr.H.W. and Vandemark. P.J. 1976. *Selected Exercises From Microbes in Action a Laboratory Manual of Microbiology*. Cornell University. London.
- Sperber, M.S, and Torrie, J.H. 1982. *Requirement of Clostridium botulinum for Growth and Toxin Production*. J. Food Tech. 36 (1), 89-97.

Suhartono, M.T. 1989. *Enzin dan Bioteknologi*. PAU - Bioteknologi IPB. Bogor

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.

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. 2010. *Bakteri Bacillus mycooides*. http://wikipedia.id/Bakteri_mycooides/klasifikasibakteriBacillus/image.php. Diakses 27 Juni 2010.

Yumei dan Yulia. 2008. *Metode Penelitian Sosial (Resume)*. http://images.deejulz.multiply.multiplycontent.com/attachment/0/SK1kaQoKCr4AAB@yyvc1/Metode%20Penelitian%20Sosial_Resume.doc?nmid=111593288. Diakses 30 Agustus 2009.

Zaelanie, K dan R. Nurdiani. 2004. *Diktat Kuliah Teknologi Hasil Perikanan I (THP I)*. Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya. Malang.

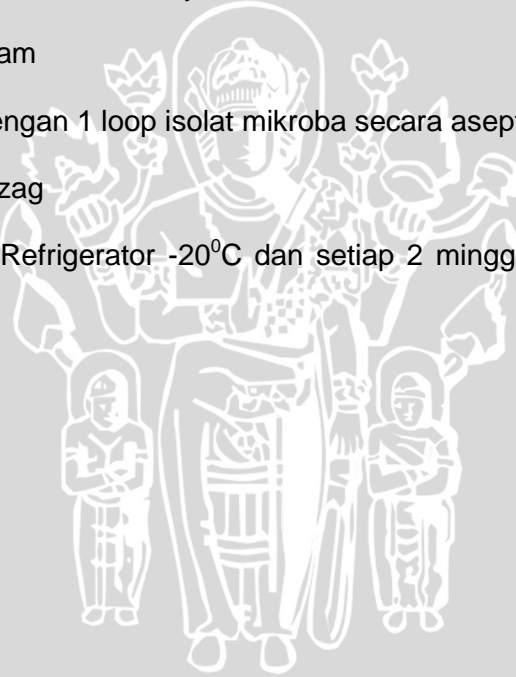


LAMPIRAN

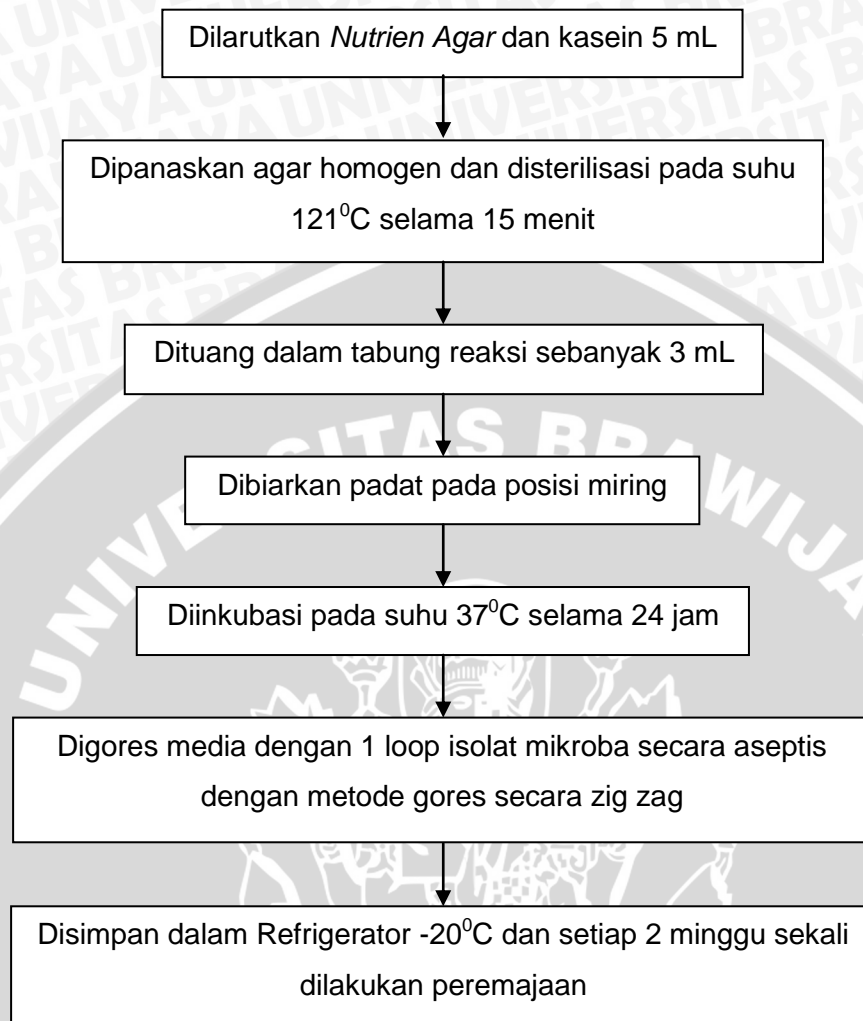
Lampiran 1. Pembuatan Kultur Stok Isolat

1.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat

- Dilarutkan *Nutrien Agar* dan kasein 5 mL
- 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
- Disimpan dalam Refrigerator -20°C dan setiap 2 minggu sekali dilakukan peremajaan



1.2 Skema Pembuatan Kultur Stok Biakan Bakteri

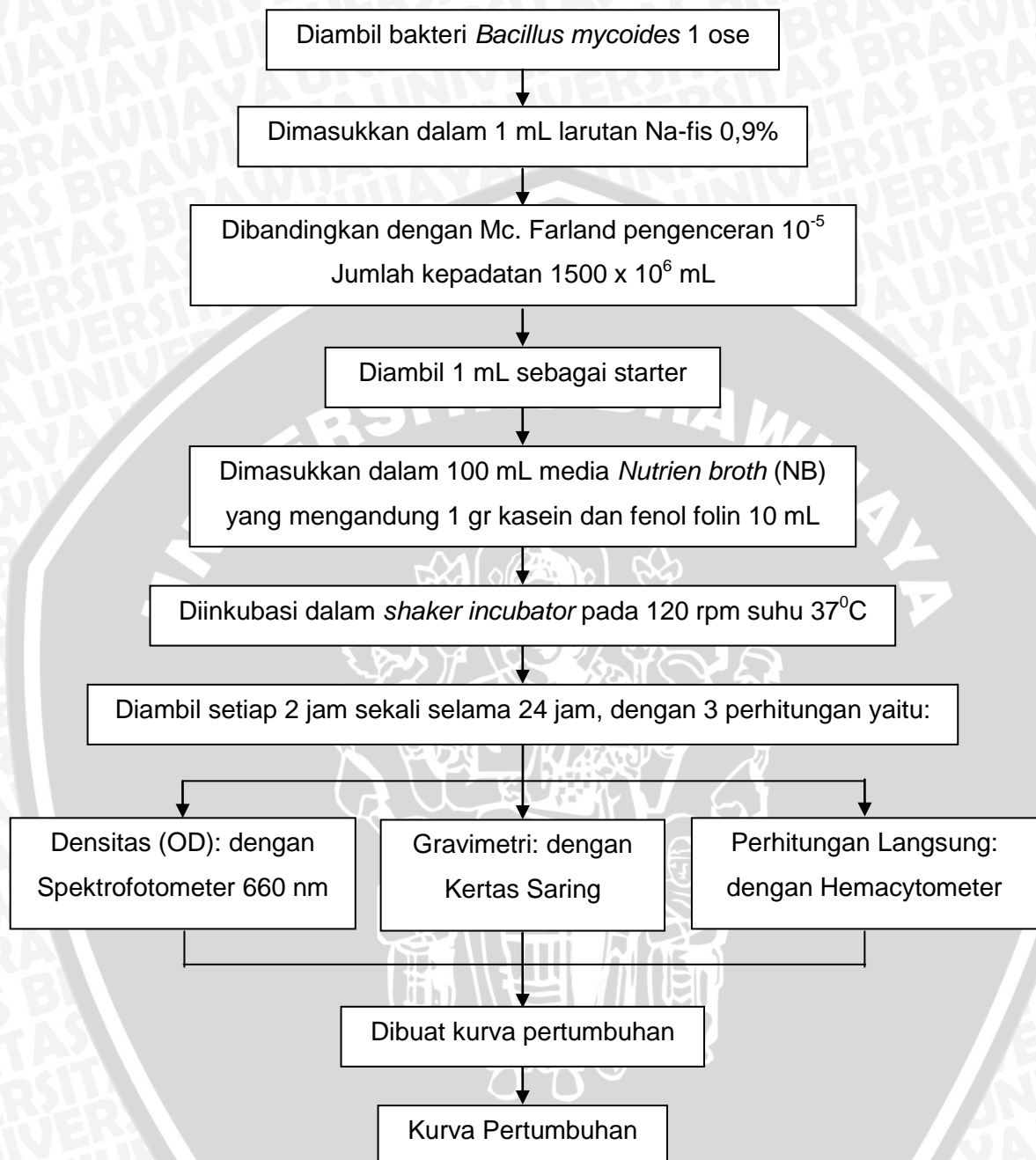


Lampiran 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

- Diambil bakteri *Bacillus mycooides* sebanyak 1 ose dari stok biakan bakteri
- Dimasukkan ke dalam 1 mL larutan Na-fis 0,9%
- Dibandingkan dengan Mc. Farland pengenceran 10^{-5} 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 10 mL
- 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 Hemacytometer
- Dibuat kurva pertumbuhan
- Kurva Pertumbuhan

2.2 Skema Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

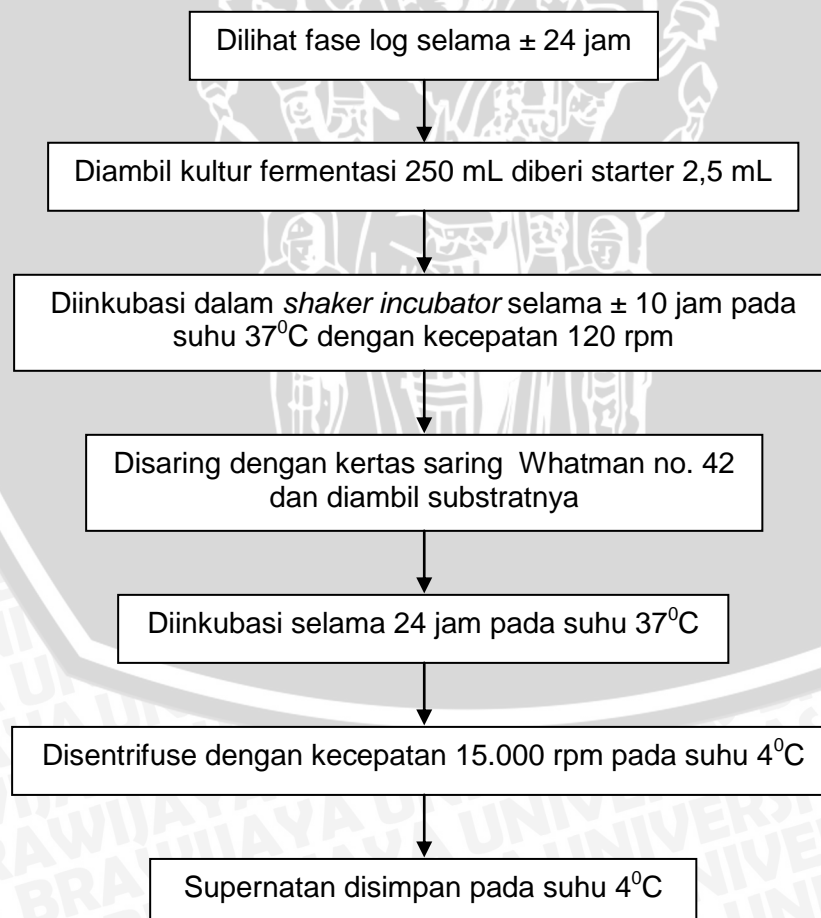


Lampiran 3. Penentuan Produksi Enzim (*crude* enzim)

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 Penentuan Produksi Enzim (*crude* enzim)

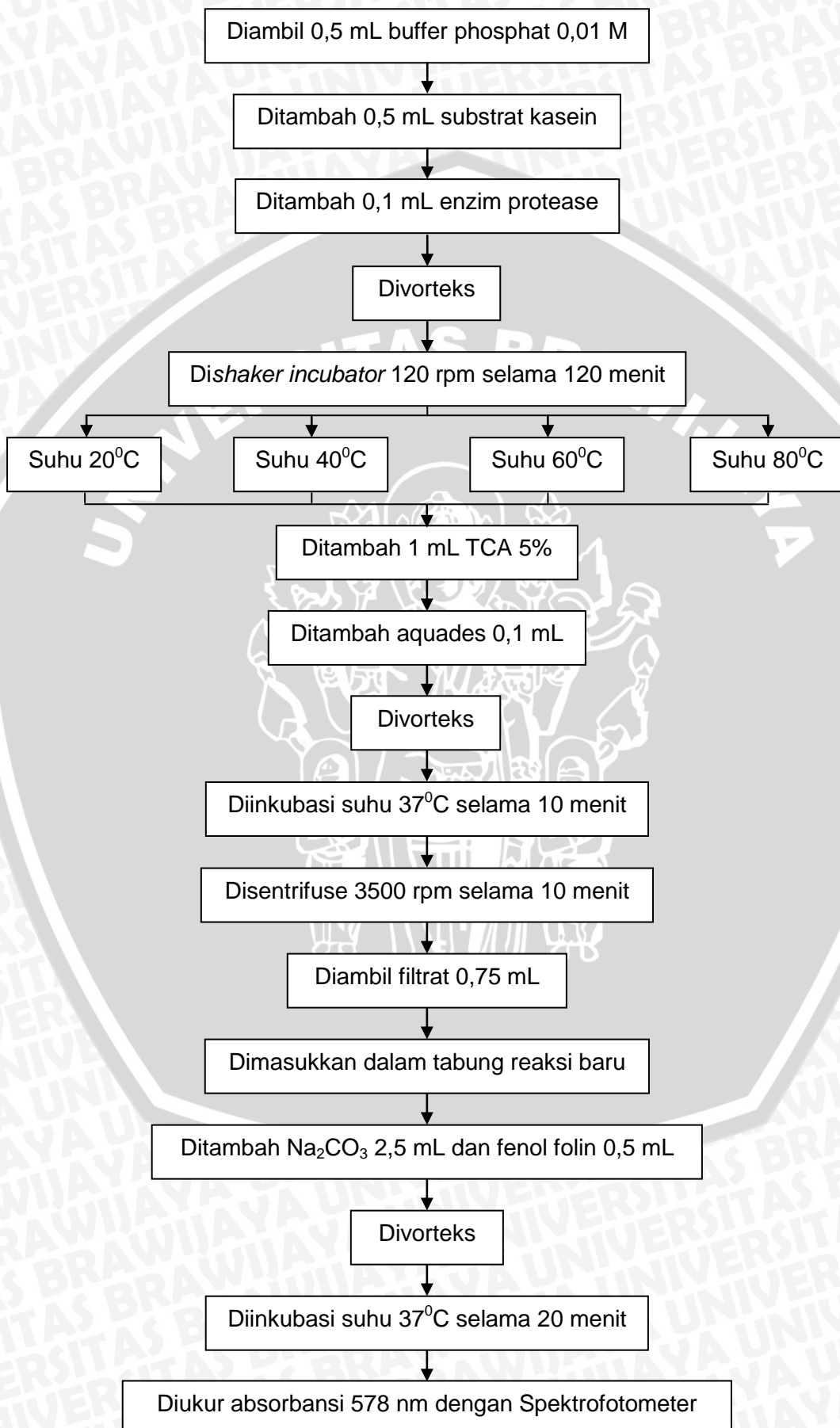


Lampiran 4. Penentuan Suhu Optimum

4.1 Penentuan Suhu 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 suhu 20°C, 40°C, 60°C dan 80°C
- Ditambahkan dengan 1 mL TCA 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 Suhu Optimum

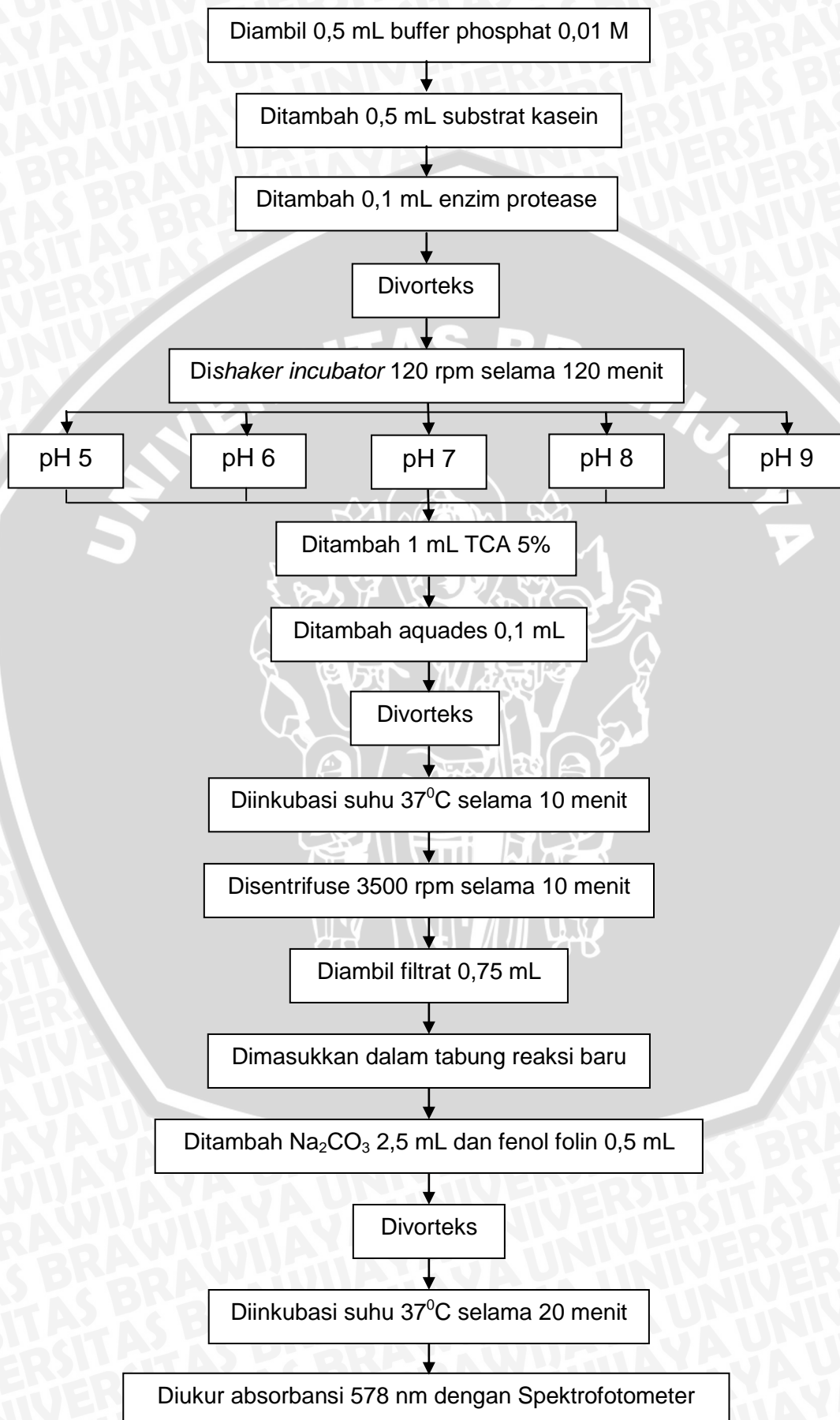


Lampiran 5. Penentuan pH Optimum

5.1 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 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

5.2 Skema Penentuan pH Optimum

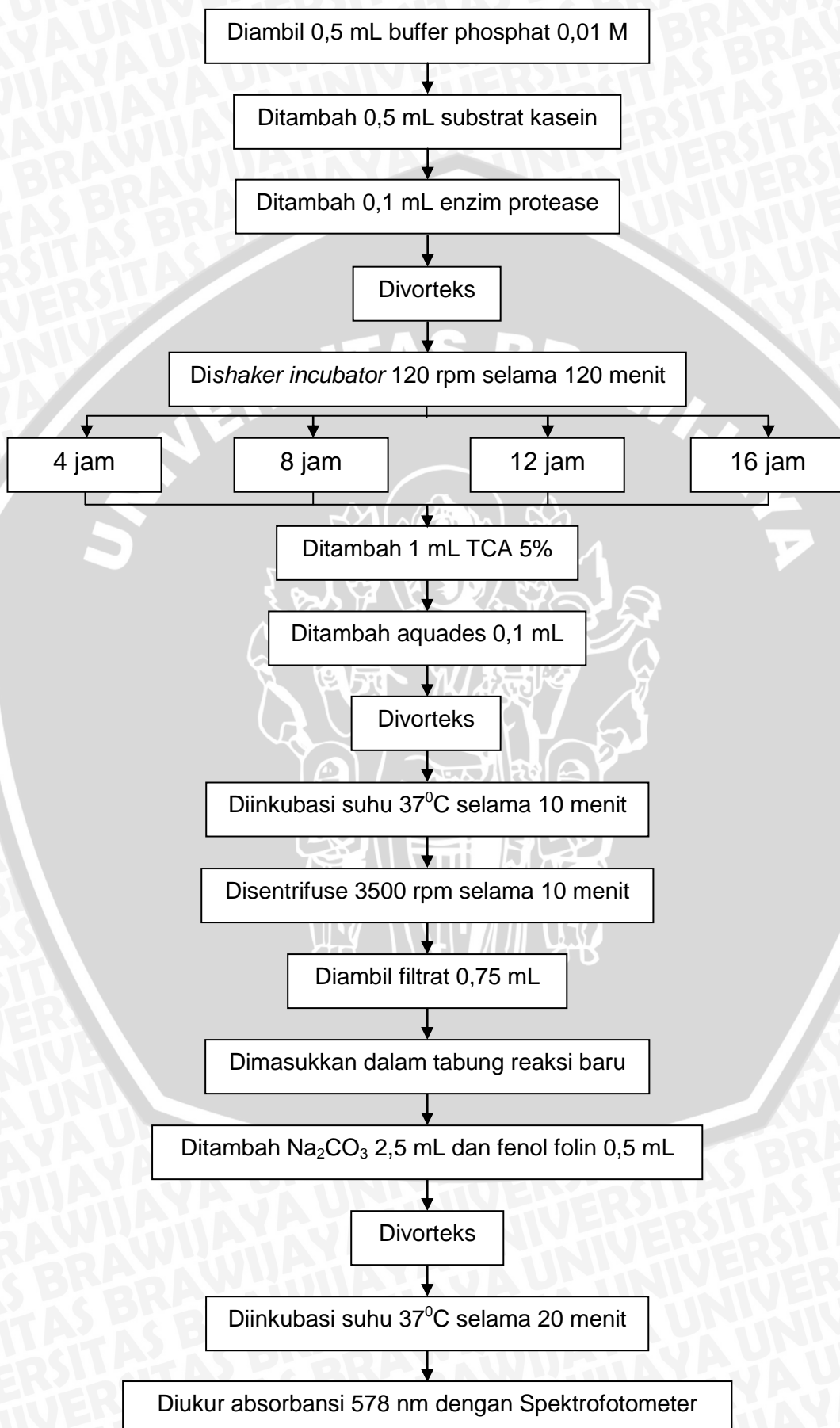


Lampiran 6. Penentuan Waktu Inkubasi

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 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_{max} dan K_m **7.1 Tahap-Tahap Penentuan V_{max} dan K_m** **7.1.1 Pembuatan Sampel**

- Kasein 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 fosfat
- 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 5% dan 0,2 mL $CaCl_2$ 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 Na_2CO_3 dan 1 mL pereaksi folin-phenol ciocalteu
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

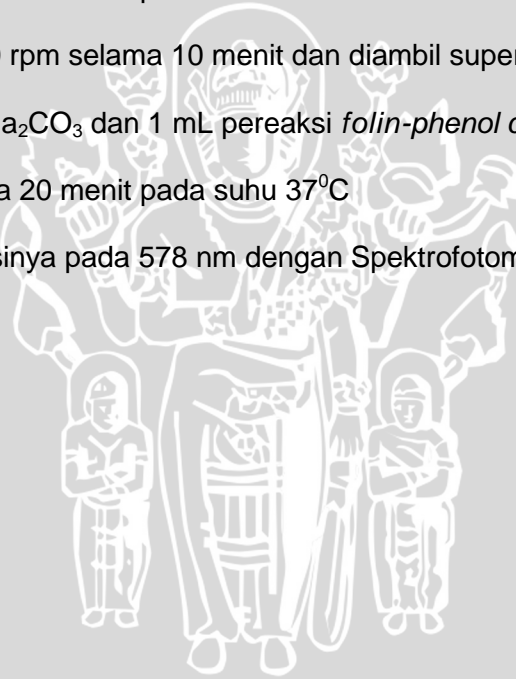
7.1.2 Pembuatan Blanko

- 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 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 Na_2CO_3 dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

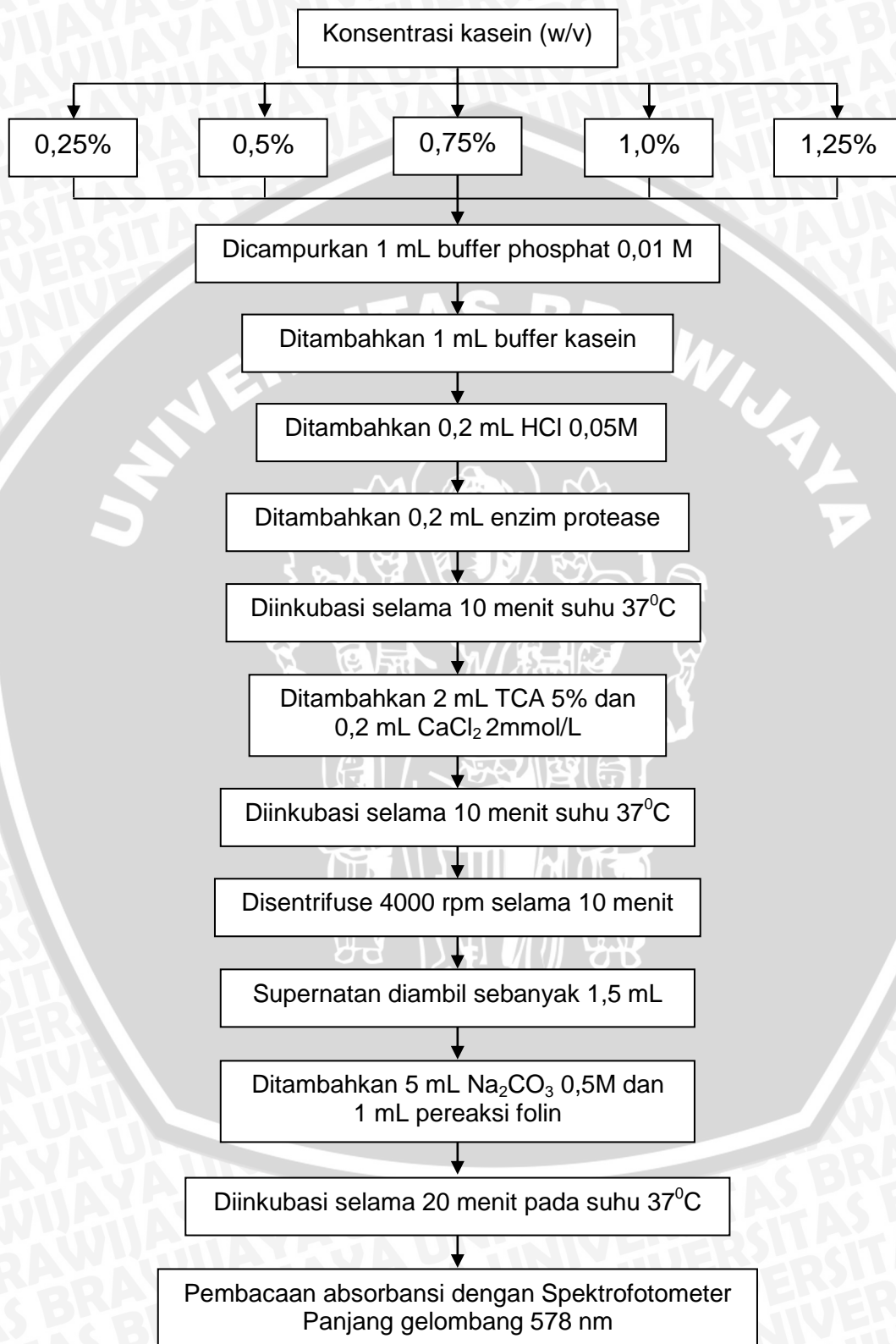
7.1.3 Pembuatan Standar

- 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 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 Na_2CO_3 dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

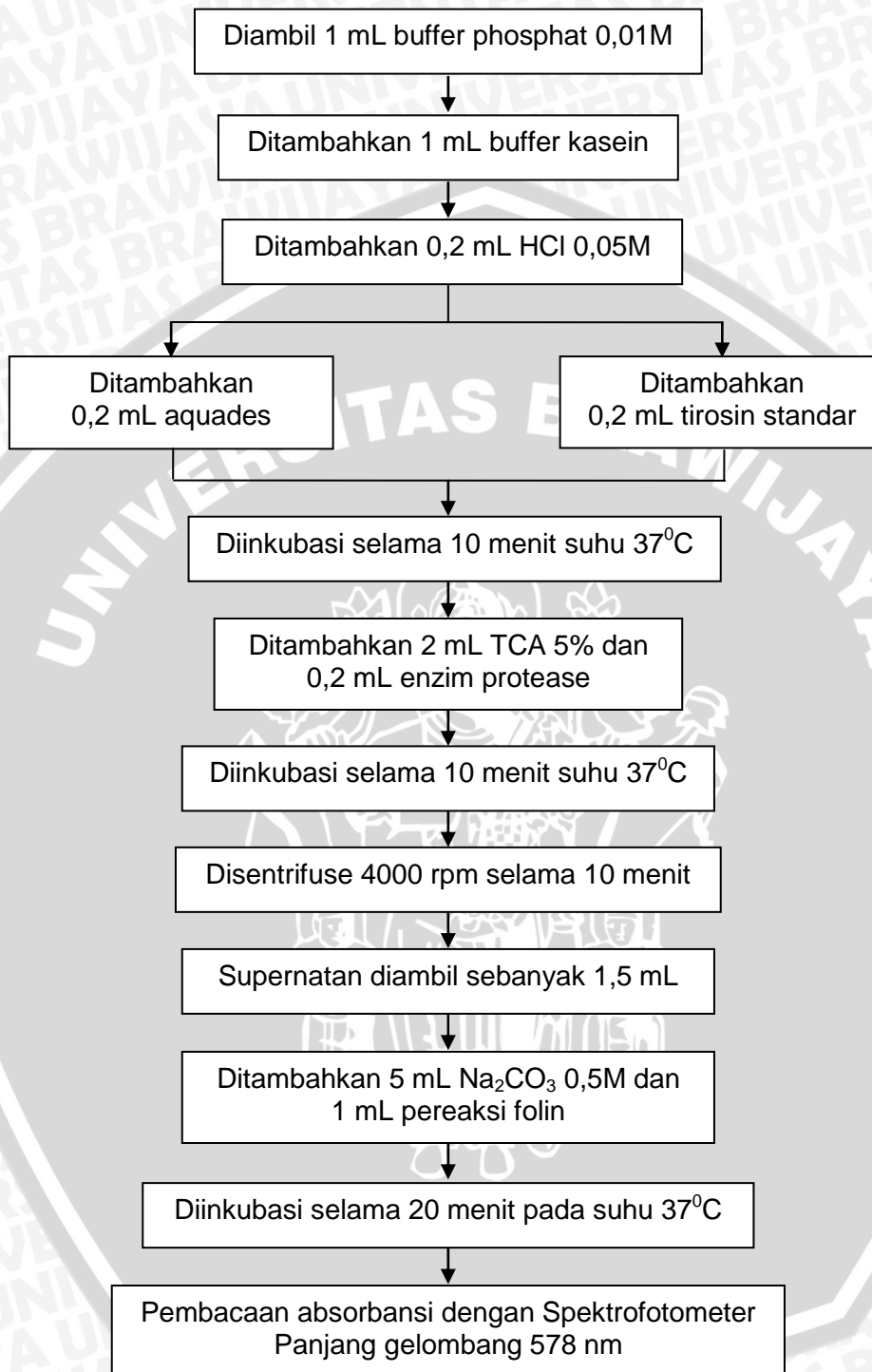


7.2 Skema Penentuan V_{maks} dan K_m

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 (Kosim dan Putra, 2009)

- 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) (Kosim dan Putra, 2009)

Penyebab kesalahan sistematis 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 **gelas** 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.

- c. 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, 2010).



Lampiran 10. Analisa Perhitungan Langsung

10.1 Langkah-langkah Analisa Perhitungan Langsung (Kosim dan Putra, 2009)

Menggunakan kotak sedang:

- a) 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 mycooides*

Pengenceran	Ulangan ke-		Rerata
	1	2	
0,25%	0,421	0,504	0,463
0,50%	0,616	0,599	0,608
0,75%	0,713	0,685	0,699
1,00%	0,763	0,765	0,764
1,25%	0,870	0,899	0,885

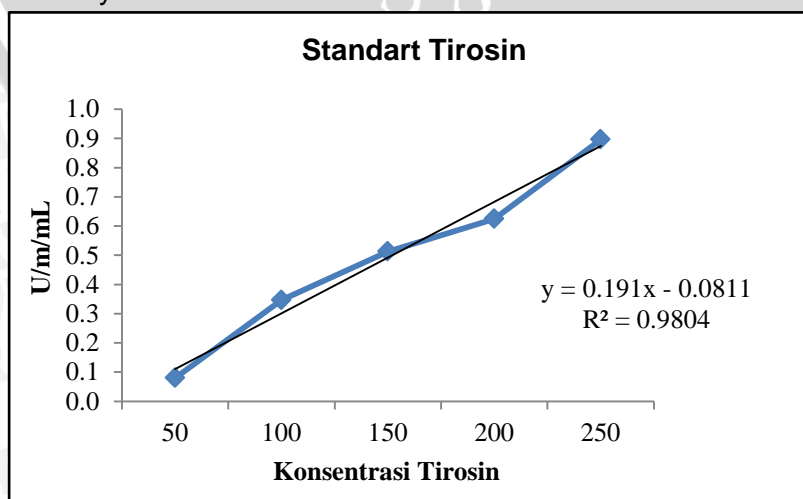
Perhitungan Kecepatan Reaksi (V)

Untuk mendapatkan nilai kecepatan reaksi (V) dihitung terlebih dulu konsentrasi hidrolisat berdasarkan persamaan regresi linear kurva standar tirosin yaitu:

Standar tirosin yang digunakan yaitu:

Konsentrasi	Tirosin		Rerata
	1	2	
50 ppm	0,084	0,076	0,080
100 ppm	0,346	0,347	0,347
150 ppm	0,516	0,509	0,513
200 ppm	0,619	0,630	0,625
250 ppm	0,894	0,898	0,896

Dari standar tirosin yang digunakan diatas kemudian dibuat regresi linear kurva standar tirosin, dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y.



Dari grafik diatas didapatkan persamaan yaitu:

$$Y = 0,191x - 0,081$$

Sehingga konsentrasi masing – masing sampel dapat dihitung dengan rumus

tersebut untuk mencari konsentrasi x, hasil absorbansi dimasukkan dalam y

sebagai berikut:

Pengenceran (%)	Absorbansi	$X = (Y + 0,081)/0,191$	Konsentrasi (ppm)
0,25	0,463	$X = (0,463 + 0,081)/0,191$	2,8481675
0,50	0,608	$X = (0,608 + 0,081)/0,191$	3,6073298
0,75	0,699	$X = (0,699 + 0,081)/0,191$	4,0837696
1,00	0,764	$X = (0,764 + 0,081)/0,191$	4,4240838
1,25	0,885	$X = (0,885 + 0,081)/0,191$	5,0575916

Kecepatan reaksi (V) masing-masing hidrolisis pada berbagai konsentrasi enzim:

Substrat dapat dihitung dengan rumus:

$$V = \mu\text{mol}/\text{menit}/\text{Liter}$$

Konsentrasi (ppm)	Pengenceran 100x	V ($\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{L}$)	1/V
2,8481675	284,81675	0,000157192	6361,634191
3,6073298	360,73298	0,000199091	5022,828737
4,0837696	408,37696	0,000225386	4436,832051
4,4240838	442,40838	0,000244168	4095,537278
5,0575916	505,75916	0,000279132	3582,535197

Perhitungan Konsentrasi Substrat (S)

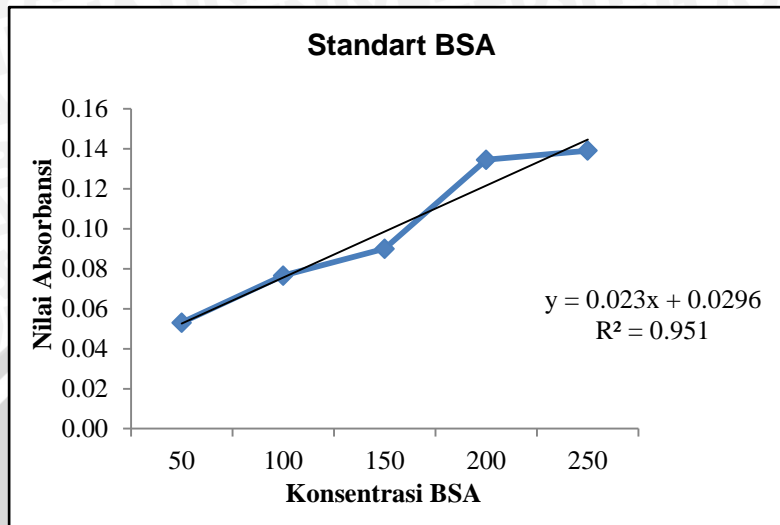
Untuk mendapatkan nilai konsentrasi substrat dihitung terlebih dahulu

konsentrasi masing-masing sampel berdasarkan persamaan regresi linear kurva

standart BSA yaitu:

Konsentrasi	BSA		Rerata
	1	2	
50 ppm	0,055	0,051	0,053
100 ppm	0,076	0,077	0,077
150 ppm	0,087	0,093	0,090
200 ppm	0,132	0,137	0,135
250 ppm	0,140	0,138	0,139

Dari standar BSA yang digunakan diatas kemudian dibuat regresi linear kurva standar tirosin, dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y.



Dari grafik diatas didapatkan persamaan yaitu :

$$y = 0.023x + 0,029$$

Sehingga masing – masing hidrolisat (enzim : substrat) dapat dihitung dengan rumus tersebut, untuk mencari konsentrasi (x), hasil absorbansi dimasukkan dalam y, sebagai berikut :

Pengenceran (%)	Absorbansi	$X = (Y - 0,029)/0,023$	Konsentrasi (ppm)
0,25	0,463	$X = (0,463 - 0,029)/0,023$	18,86957
0,50	0,608	$X = (0,608 - 0,029)/0,023$	25,17391
0,75	0,699	$X = (0,699 - 0,029)/0,023$	29,13043
1,00	0,764	$X = (0,764 - 0,029)/0,023$	31,95652
1,25	0,885	$X = (0,885 - 0,029)/0,023$	37,21739

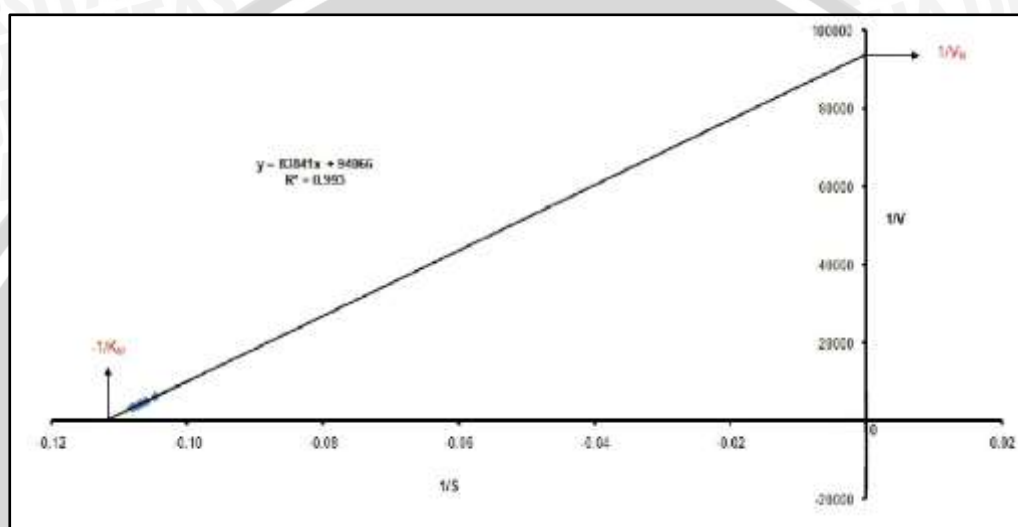
Konsentrasi substrat (S) masing-masing hidrolisis pada berbagai konsentrasi enzim : substrat dapat dihitung dengan rumus : konsentrasi substrat

$$S = \mu\text{mol/menit/Liter}$$

Konsentrasi (ppm)	gr	S	Log S	1/S
18,86957	$1,88696 \times 10^{-05}$	$2,81635 \times 10^{-10}$	-9,550312909	-0,104709
25,17391	$2,51739 \times 10^{-05}$	$3,75730 \times 10^{-10}$	-9,425124075	-0,106099
29,13043	$2,91304 \times 10^{-05}$	$4,34783 \times 10^{-10}$	-9,361727836	-0,106818
31,95652	$3,19565 \times 10^{-05}$	$4,76963 \times 10^{-10}$	-9,321515300	-0,107279
37,21739	$3,72174 \times 10^{-05}$	$5,55483 \times 10^{-10}$	-9,255328874	-0,108046

Pembuatan Kurva Lineweaver-Burk

Dibuat grafik kurva lineweaver – burk yang menyatakan hubungan antara perubahan konsentrasi $1/[S]$ dengan kecepatan reaksi $1/v$, dengan $1/[S]$ sebagai sumbu x dan $1/v$ sebagai sumbu y untuk mendapatkan nilai kecepatan maksimum (V_{maks}) dan konstanta Michaelis – Menten (K_M). kurva lineweaver – burk dibuat dengan menggunakan Microsoft Exel 2007.



Perhitungan K_M

Untuk mengetahui afinitas enzim substrat (ES) dapat diketahui dari persamaan kurva lineweaver – burk yaitu $y = 83841x + 94066$ dimana untuk mendapatkan nilai K_m (x), y harus dijadikan nol. Perhitungannya sebagai berikut:

$$0 = 83841x + 94066$$

$$83841x = - 94066$$

$$x = - 1,121957$$

$$-1/K_m = - 1,121957$$

$$K_m = 0,8912998 \text{ M}$$

$$= 0,8912998 \times 10^3 \text{ mM}$$

$$= 891,2998 \text{ mM}$$

Perhitungan V_{maks}

Untuk mengetahui kecepatan reaksi maksimum enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus mycooides* dapat diketahui dari persamaan kurva linier diatas $y = 83841x + 94066$ dimana untuk mendapatkan kecepatan reaksi maksimum (y), x harus dijadikan nol. Perhitungannya sebagai berikut:

$$1/V_{\text{maks}} = 94066$$

$$V_{\text{maks}} = 0,0000106 \text{ M L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$= 0,0106 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 12. Perhitungan Penentuan Suhu Optimum

Suhu	Ulangan ke-		Total	Rerata	STD
	1	2			
20°C	0,611	0,722	1,333	0,667	0,078
40°C	1,074	0,925	1,999	1,000	0,105
60°C	0,556	0,500	1,056	0,528	0,040
80°C	0,537	0,315	0,852	0,426	0,157

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
- Abl : Nilai absorbansi blanko
- T : Waktu Inkubasi (menit)

▪ Suhu 20⁰C

Ulangan 1:

$$U = \frac{0,095 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 0,611 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,101 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 0,722 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 0,667 \text{ U/m/mL}$$

▪ Suhu 40°C**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,120 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,074 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,112 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 0,925 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 1,000 U/m/mL

▪ Suhu 60°C**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,098 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 0,556 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,089 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 0,500 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 0,528 U/m/mL

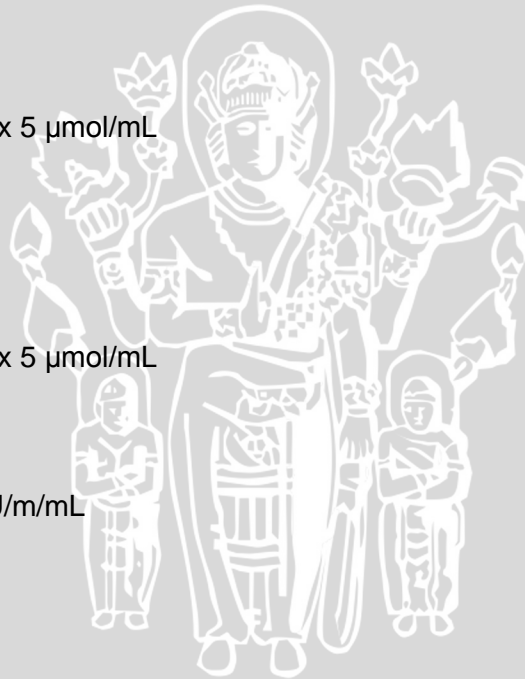
▪ Suhu 80°C**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,091 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 0,537 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,079 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 0,315 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 0,426 U/m/mL



Lampiran 13. Perhitungan Penentuan pH Optimum

pH	Ulangan ke-		Total	Rerata	STD
	1	2			
5	1,796	1,907	3,703	1,852	0,078
6	2,351	2,462	4,813	2,407	0,078
7	1,963	2,130	4,093	2,047	0,118
8	1,796	1,999	3,795	1,898	0,144
9	1,278	1,241	2,519	1,260	0,026

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**

Ulangan 1:

$$U = \frac{0,159 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,796 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,165 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,907 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,852 \text{ U/m/mL}$$

pH 6**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,189 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 2,351 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,195 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 2,462 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 2,407 \text{ U/m/mL}$$

pH 7**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,168 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,963 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,177 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 2,130 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 2,047 \text{ U/m/mL}$$

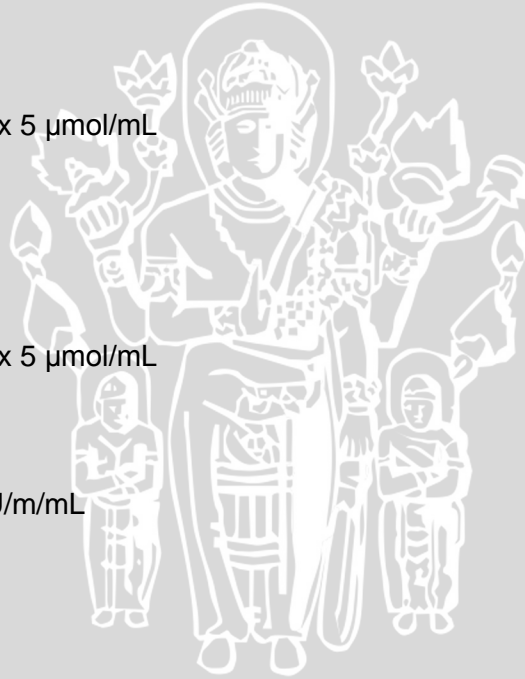
pH 8**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,159 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,796 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,164 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,999 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,898 \text{ U/m/mL}$$



- pH 9

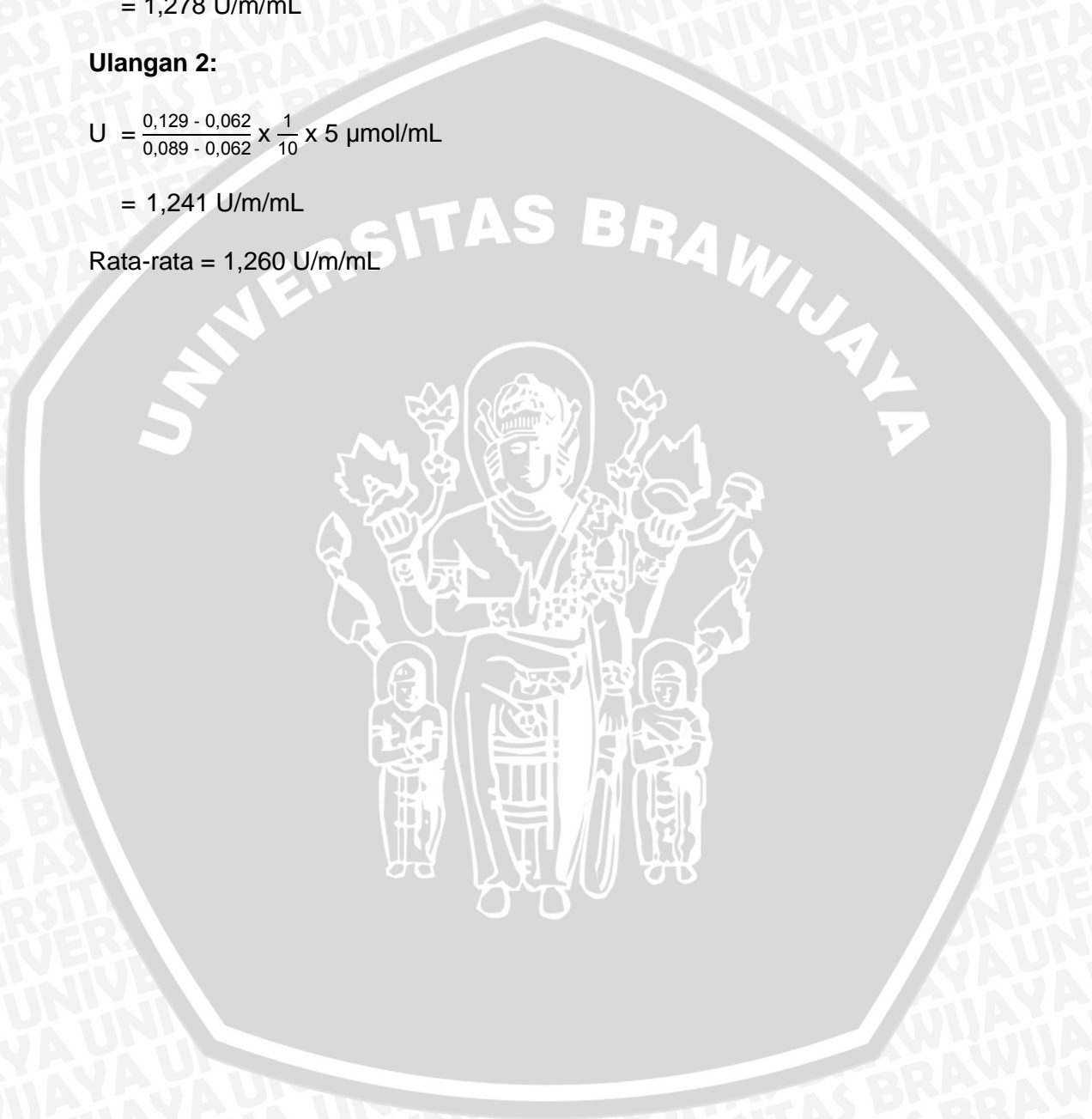
Ulangan 1:

$$U = \frac{0,131 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,278 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

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

Rata-rata = 1,260 U/m/mL



Lampiran 14. Perhitungan Penentuan Waktu Inkubasi

Waktu	Ulangan ke-		Total	Rerata	STD
	1	2			
4 jam	4,871	4,796	9,667	4,834	0,053
8 jam	5,315	5,444	10,759	5,380	0,091
12 jam	5,944	5,741	11,685	5,843	0,144
16 jam	5,537	5,500	11,037	5,519	0,026

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**

Ulangan 1:

$$U = \frac{0,325 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 4,871 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,321 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 4,796 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 4,834 \text{ U/m/mL}$$

Waktu Inkubasi 8 jam**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,349 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 5,315 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,356 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 5,444 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 5,380 \text{ U/m/mL}$$

Waktu Inkubasi 12 jam**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,383 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 5,944 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,372 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 5,741 \text{ U/m/mL}$$

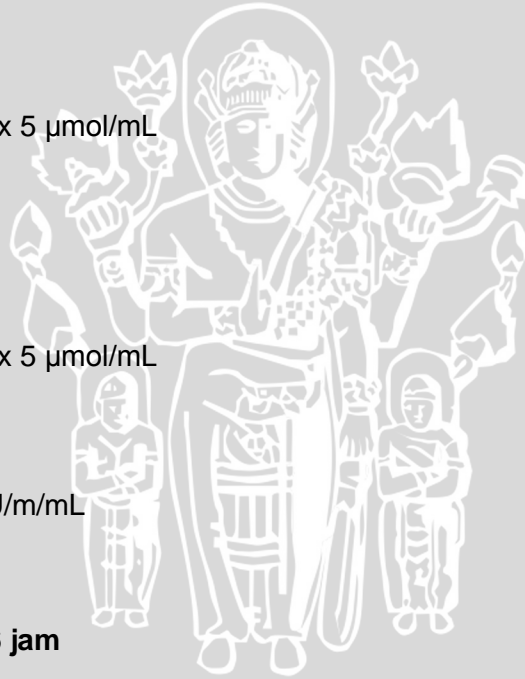
$$\text{Rata-rata} = 5,843 \text{ U/m/mL}$$

Waktu Inkubasi 16 jam**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,361 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 5,537 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,359 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 5,500 \text{ U/m/mL}$$



Rata-rata = 5,519 U/m/mL

