

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

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

Oleh:

**MAHBUB ZUNAI  
NIM. 0810832002**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2012**

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

**LAPORAN SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana  
pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya Malang**

Oleh :

**MAHBUB ZUNAI  
NIM. 0810832002**



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

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

Oleh :

**MAHBUB ZUNAI  
NIM. 0810832002**

**Dosen Penguji I**

**(Asep A. Prihanto, S.Pi. MP)  
NIP. 19581231 198601 2 002  
Tanggal : .....**

**Dosen Penguji II**

**(Ir. Yahya, MP)  
NIP. 19630706 199003 1 005  
Tanggal : .....**

**Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I**

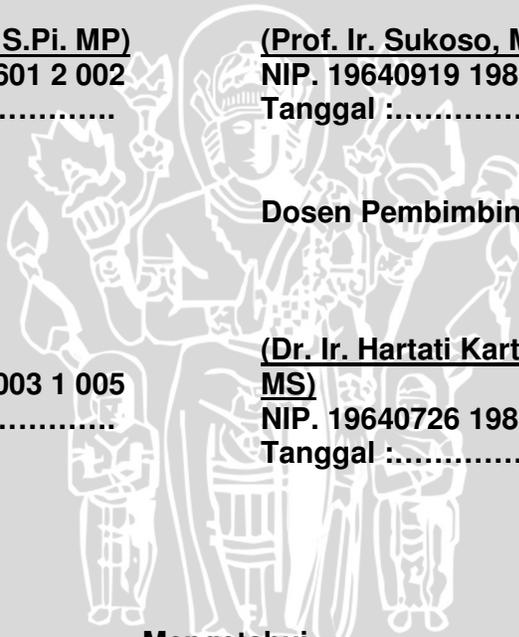
**(Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D)  
NIP. 19640919 198903 1 002  
Tanggal : .....**

**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

**Mahbub Zunaidi (0810832002).** Skripsi tentang Karakteristik Aktivitas Protease Bakteri *Bacillus subtilis* Dari isolat Ikan Teri (*Stolephorus spp.*) Asin, dibawah 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 subtilis* dari isolat ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease ini terdiri dari bakteri *Bacillus subtilis* 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*,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5M didapatkan dari Panadia *Laboratory*, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang. Kertas saring Whatman no. 42, pereaksi folin,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5M, buffer fosfat 0,01M, HCl 0,05M,  $\text{CaCl}_2$  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. Artinya, penelitian dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus, yang masih kurang diketahui orang. Penelitian jenis ini bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai suatu gejala tertentu atau mendapatkan ide-ide baru mengenai gejala itu dengan maksud untuk merumuskan masalahnya secara lebih terperinci. Untuk mencapai tujuan utama yaitu mengetahui karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus subtilis* dari isolasi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

Karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus subtilis* dari isolat ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin memiliki fase log pada jam ke-10 dengan jumlah bakteri  $432 \times 10^5$  sel/mL, suhu optimum enzim protease pada suhu  $40^\circ\text{C}$  dengan jumlah bakteri sebesar 1,241 U/menit/mL, pH optimum pada pH 6 dengan dengan jumlah bakteri sebesar 2,565 U/menit/mL, waktu inkubasi pada jam ke-12 dengan jumlah bakteri sebesar 5,426 U/menit/mL, dan mempunyai nilai  $V_{\text{maks}}$  sebesar  $0.0114 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  dan  $K_m$  sebesar 887,9178 mM. Disarankan perlu adanya penelitian mengenai purifikasi enzim protease *Bacillus subtilis* dari isolasi ikan teri (*Steloporos spp.*) asin serta perlu adanya penelitian yang sama tetapi menggunakan metode berbeda agar dapat dijadikan sebagai perbandingan dengan penelitian sebelumnya.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul KARAKTERISTIK AKTIVITAS PROTEASE BAKTERI *Bacillus subtilis* DARI ISOLAT IKAN TERI (*Stolephorus spp.*) ASIN dapat terselesaikan. 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, dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih M.S selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan sehingga laporan ini dapat tersusun.
2. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Bapak ( M. Tholhah ) dan Ibu ( Siti Aisjah ), kakak-kakak dan Anak-anaknya tercinta, keluarga njoyo ( G3 ), Jentri Citra Amalia ( Someone special ), teman-teman semua atas doa dan dukungan yang tidak pernah berhenti selama ini.

Semoga Allah SWT. memberikan balasan yang lebih atas jasa dan kebaikan mereka. Penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan dalam laporan ini, semoga bisa dijadikan maklum. Semoga dapat bermanfaat bagi khususnya bagi penulis dan bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Juni 2012

Mahbub Zunaidi

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>RINGKASAN</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	iv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	v
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	vi
<b>1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Kegunaan Penelitian.....	5
1.5 Tempat dan Waktu.....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
2.2 Bakteri Proteolitik.....	7
2.3 Enzim Protease.....	9
2.4 Isolasi Bakteri.....	11
2.5 Isolasi Bakteri Proteolitik.....	12
2.6 Karakteristik Bakteri Proteolitik.....	13
2.7 Kurva Pertumbuhan.....	14
2.7.1 Analisa Gravimetri.....	16
2.7.2 Analisa <i>Optical Density</i> .....	17
2.7.3 Analisa Perhitungan Langsung.....	18
2.7.4 Pengujian Aktivitas Protease.....	19
2.8 Penentuan $K_m$ dan $V_{maks}$ .....	20
<b>3. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Materi Penelitian.....	21
3.1.1 Bahan Penelitian.....	21
3.1.2 Alat Penelitian.....	21
3.2 Metode Penelitian.....	22
3.3 Prosedur Penelitian.....	22
3.3.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat.....	22
3.3.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> .....	23
3.3.2.1 Analisa Gravimetri (Kosim dan putra, 2009).....	24
3.3.2.2 Analisa <i>Optical Density</i> (OD)(Kosim dan putra, 2009).....	24
3.3.2.3 Analisa Perhitungan Langsung(Kosim dan putra, 2009).....	25
3.3.3 Produksi Enzim ( <i>Crude Enzim</i> ).....	25
3.3.4 Pengujian Aktivitas Protease.....	26
3.3.4.1 Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease.....	26
3.3.4.2 Penentuan pH Optimum Enzim Protease.....	27
3.3.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Enzim Protease.....	27
3.3.5 Penentuan $V_{maks}$ dan $K_m$ (Penentuan Michaelis-Menten).....	27

**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 *Optical Density*) ..... 32

4.2 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan Suhu..... 33

4.3 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan pH ..... 35

4.4 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan Waktu Inkubasi..... 36

4.5 Penentuan  $V_{maks}$  dan  $K_m$ ..... 38

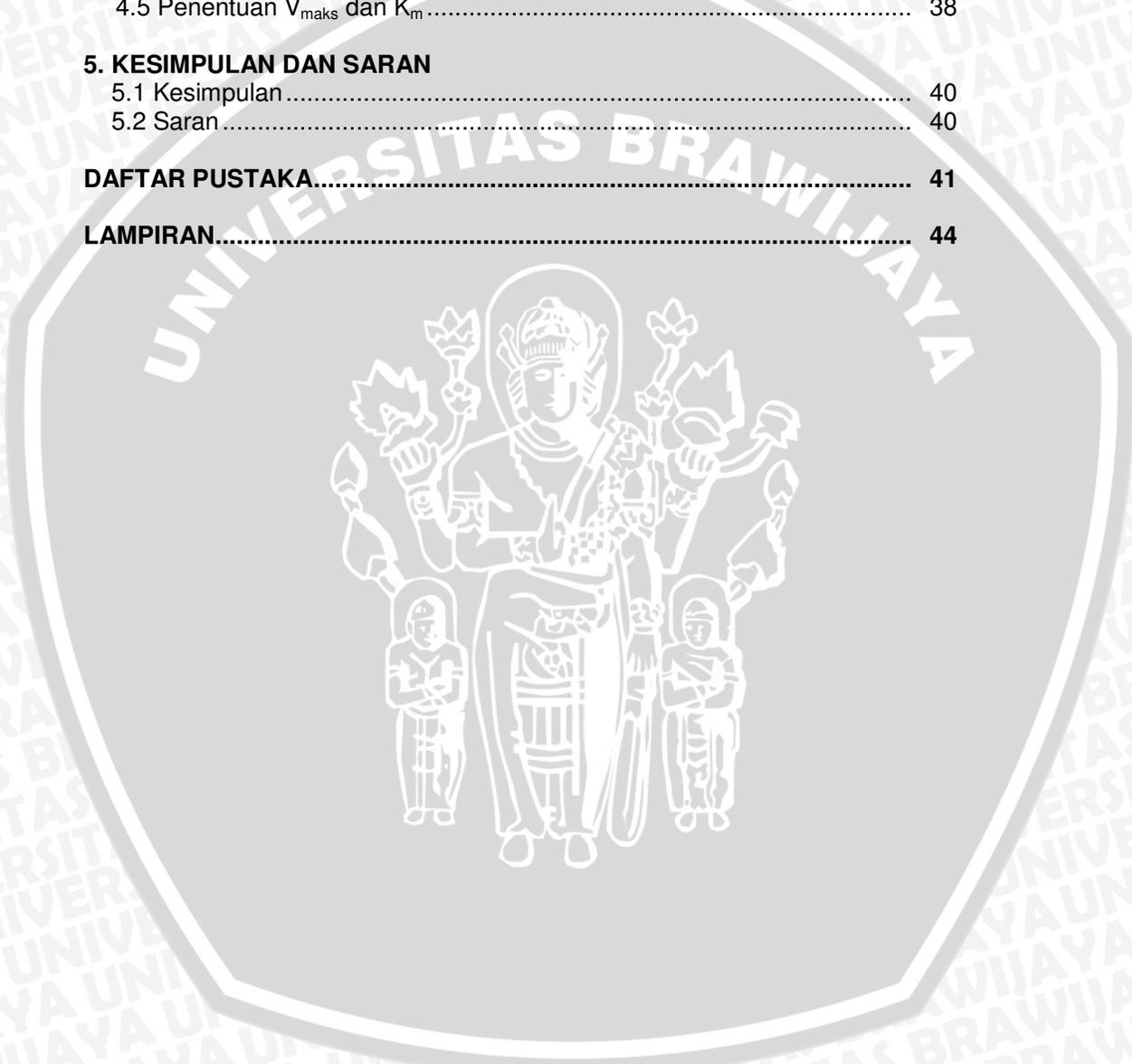
**5. KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1 Kesimpulan ..... 40

5.2 Saran ..... 40

**DAFTAR PUSTAKA..... 41**

**LAMPIRAN..... 44**



## DAFTAR TABEL

### Tabel

1. Hasil spektrofotometer enzim protease *Bacillus subtilis*.....
2. Standar tirosin.....
3. Hasil absorbansi.....
4. Kecepatan reaksi (V) .....
5. Persamaan regresi linear kurva satandart BSA.....
6. Konsentrasi (x).....
7. Konsentrasi substrat (s) hidrolisi pada berbagai konsentrasi enzim .....
8. Data Perhitungan Penentuan Suhu Optimum .....
9. Data Perhitungan Penentuan pH Optimum .....
10. Data Perhitungan Penentuan Waktu Inkubasi.....



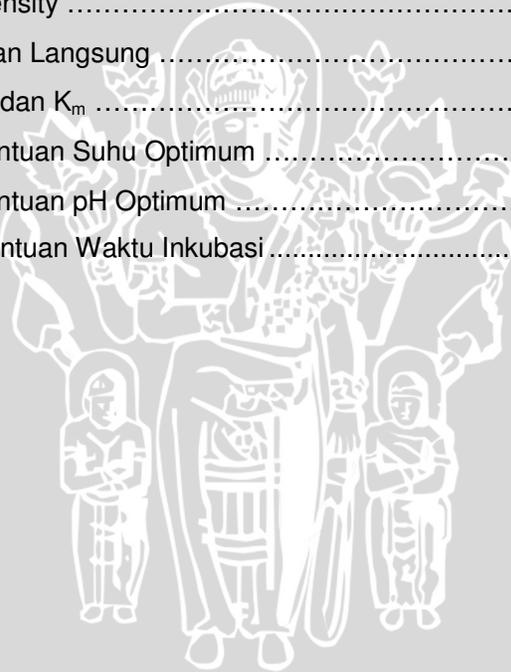
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	7
2. Grafik Hasil Analisa Gravimetri Dengan Kertas Saring.....	30
3. Grafik Hasil Analisa Haemocytometer.....	31
4. Grafik Hasil Analisa <i>Optical Density</i> Dengan Spektrofotometer .....	32
5. Kurva Aktivitas Protease Pada Variasi Suhu.....	33
6. Kurva Aktivitas Protease Pada Variasi pH.....	35
7. Kurva Aktivitas Protease Pada Variasi Waktu inkubasi .....	37
8. Grafik $V_{maks}$ dan $K_m$ .....	38



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Kultur Stok Isolat.....	
2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik.....	
3. Penentuan Produksi Enzim ( <i>crude</i> enzim) .....	
4. Penentuan Suhu Optimum.....	
5. Penentuan pH Optimum .....	
6. Penentuan Waktu Inkubasi .....	
7. Penentuan $V_{max}$ dan $K_m$ .....	
8. Langkah-langkah Analisa Gravimetri .....	
9. Analisa Optical Density .....	
10. Analisa Perhitungan Langsung .....	
11. Perhitungan $V_{maks}$ dan $K_m$ .....	
12. Perhitungan Penentuan Suhu Optimum .....	
13. Perhitungan Penentuan pH Optimum .....	
14. Perhitungan Penentuan Waktu Inkubasi.....	



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim. Bakteri proteolitik merupakan sekelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk memecah protein, dengan memutus ikatan peptida pada protein tersebut, selain melalui kemampuan tersebut bakteri proteolitik juga mempunyai kemampuan membusukkan bahan yang mengandung protein tinggi. Proses pembusukan tersebut menghasilkan senyawa hidrogen dan sulfida yang berbau busuk, serta asam amino sebagai putrefaktif protein (Kuswanto dan Sudarmadji, 1989).

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 (Fardiaz, 1992). Protease ekstraseluler adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widhyastuti, 2002). Enzim ekstraseluler disekresikan keluar sel dan mendegradasi senyawa polimer menjadi senyawa yang lebih sederhana yang mudah larut dan diserap melalui dinding sel. Enzim ekstraseluler banyak digunakan dalam industri karena dapat dihasilkan dalam jumlah besar dan metode ekstraksi yang cukup murah, salah satu contoh bakteri ini adalah *Bacillus subtilis* (Olajuyigbe dan Ajele, 2005).

Bakteri *Bacillus subtilis* selnya berbentuk basil, ada yang tebal dan ada yang tipis, biasanya berbentuk rantai atau terpisah, sebagian motil dan adapula yang non motil, semua membentuk endospora yang berbentuk bulat dan oval. *Bacillus subtilis* ini awalnya bernama *Vibro subtilis* oleh Christian Gottfried Ehrenberg pada Tahun 1835. Kemudian nama *Bacillus subtilis* dikenalkan oleh Ferdinand Cohn pada 1872 (Wikipedia, 2011). *Bacillus subtilis* merupakan salah satu yang paling banyak digunakan untuk produksi enzim dan bahan kimia khusus, aplikasi industri termasuk produksi amilase, protease, inosine, ribosides, dan asam amino. Enzim diproduksi oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis* secara luas, bakteri ini dapat memainkan peran dalam pengamanan limbah pembuangan dengan mengikat proton properti dari permukaan (Kastanya, 2008).

Protease sebagai satu enzim industri menguasai 60% total pemasaran enzim dunia. Protease memiliki banyak manfaat dibidang bioteknologi antara lain dalam industri roti, keju, kulit, detergen, farmasi, dan daegradasi limbah ramah lingkungan. Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim (Akhdy, 2003).

Saat ini protease yang bersumber dari mikroorganisme halofilik lebih banyak digunakan dalam bidang industri, terutama industri yang menggunakan penggaraman dalam prosesnya. Hal ini terjadi karena enzim yang berasal dari mikroorganisme tersebut memiliki stabilitas dan aktivitas yang tetap optimal pada kondisi lingkungan yang berkadar garam tinggi. Bakteri halofilik mampu hidup secara optimal di lingkungan berkadar garam tinggi hingga 30% dengan struktur

protein penyusun yang tetap stabil atau tidak terdenaturasi. Bakteri halofilik merupakan penghasil protease yang telah berhasil diisolasi oleh Sianturi (2008).

Dalam identifikasi bakteri proteolitik ikan asin yang sudah mengalami perendaman garam yang tinggi dan proses pengeringan pada suhu dan  $a_w$  tertentu, dengan adanya perlakuan tersebut bakteri halofilik mampu tumbuh. Bakteri halofilik membutuhkan konsentrasi NaCl minimal yang telah ditentukan, untuk pertumbuhan optimumnya bervariasi yaitu sekitar 2-5% garam disebut halofilik ringan, 5-20% untuk bakteri halofilik sedang dan 20-30% untuk bakteri halofilik ekstrim. Bakteri-bakteri tersebut diantaranya tergolong dalam jenis *Halobacterium*, *Halococcus*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pediococcus*, dan *Alcaligenes* (Fardiaz, 1992).

Kondisi pada ikan teri asin termasuk ekstrim untuk pertumbuhan mikroba, bakteri yang mampu tumbuh dalam kondisi ekstrim tersebut berpotensi digunakan untuk pengolahan industri perikanan lebih lanjut. Penelitian yang dilakukan oleh Wibowo (2009), yang mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri halofilik dari ikan asin dapat diidentifikasi isolat bakteri proteolitik yang mengacu pada Ventosa, *et. al.*, (1998) dan Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (1994) menunjukkan bahwa bakteri halofilik yang ditemukan adalah *Deleya cupidus1*, *Deleya cupidus2*, *Deleya spesies1*, *Deleya spesies2*, *Kurthia spesies1*, *kurthia spesies2*.

Ada beberapa Penelitian lain yang telah dilakukan mengenai bakteri proteolitik halofilik diantaranya adalah dilakukan oleh Sopiah dan Susanto (2008), yang telah mengisolasi bakteri proteolitik yang terdapat dalam limbah cangkang udang dapat diidentifikasi 2 (dua) jenis koloni yang mempunyai aktivitas protease, yaitu jenis bakteri batang (*bacillus*) dan bulat (*coccus*), Penelitian yang dilakukan oleh Andriyani (2009), yang mengisolasi bakteri pada ikan asin umumnya adalah golongan bakteri halofilik yang dapat ditemukan pada makanan

yang diawetkan dengan penggaraman, isolat bakteri halofilik yang berhasil diisolasi dari penelitian tersebut berjumlah 28, penelitian yang dilakukan oleh Prabowo (2010), mengenai karakteristik bakteri proteolitik yang diisolasi dari ikan selar kuning asin diperoleh bakteri dapat tumbuh pada suhu 60°C, pH 4 dan  $a_w$  0,75 dengan morfologi koloni berbentuk bulat, tetapi tidak rata, evaluasi cembung berwarna putih dan merupakan gram positif.

Dewasa ini peranan enzim dalam industri sudah tidak diragukan lagi. Di samping amilase, protease adalah enzim yang paling banyak dimanfaatkan dalam industri pangan, minuman, farmasi, tekstil, kertas, fotografi, detergen dan kulit. Sekitar dua pertiga protease yang digunakan dihasilkan oleh mikroba, terutama bakteri dari genus *Bacillus* (Marcado, *et. al.*, 1990). Penelitian mengenai karakteristik aktivitas enzim proteolitik dari bakteri halofilik yang tumbuh pada bahan makanan belum banyak dilakukan. Dengan demikian maka dilakukan penelitian mengenai karakteristik aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

## 1.2. Rumusan Masalah

*Bacillus subtilis* dapat hidup pada kondisi ekstrim pada pemanasan yang sering digunakan untuk memasak makanan dan tahan terhadap faktor lingkungan seperti panas, asam, dan garam serta dapat berada di dalam lingkungan dalam jangka waktu yang lama. Bakteri ini mempunyai kebutuhan nutrisi yang sederhana dan mampu menghasilkan enzim protease sehingga memiliki potensi yang tinggi untuk dimanfaatkan salah satunya pada bidang industri (Graumann, 2007). Penelitian tentang karakteristik enzim protease *Bacillus subtilis* dari isolat ikan teri asin masih belum banyak dilakukan di Indonesia padahal potensi bakteri ini sangat besar untuk dimanfaatkan.

Berdasarkan uraian di atas, rumusan masalah yang ingin dijawab melalui kegiatan penelitian ini adalah bagaimanakah karakteristik enzim protease bakteri *Bacillus sp.* terutama *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mengetahui karakter aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* yang dihasilkan oleh isolasi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin meliputi suhu optimum, pH optimum, waktu inkubasi serta konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dan kecepatan maksimal ( $V_{maks}$ ).

### 1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan data tentang uji karakterisasi aktivitas enzim protease meliputi penentuan nilai suhu optimum, penentuan nilai pH optimum, waktu inkubasi, konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dan kecepatan maksimal ( $V_{maks}$ ), sebagai sumber informasi dan pembandingan untuk penelitian lebih lanjut.

### 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 Biomedic Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada bulan Desember 2011 sampai Februari 2012.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* selnya berbentuk basil, ada yang tebal dan ada yang tipis. Biasanya berbentuk rantai atau terpisah, sebagian motil dan adapula yang non motil, membentuk asam dari glukosa, sel tubuhnya memiliki ukuran sepanjang 3  $\mu\text{m}$ . Uji identifikasi dengan menggunakan metode Vosges-Prostkauer, *Bacillus mycooides* menghasilkan enzim yang mereduksi nitrat dan methylen blue dan semua membentuk endospora yang berbentuk bulat dan oval. *Bacillus subtilis* ini awalnya bernama *Vibro subtilis* oleh Christian Gottfried Ehrenberg pada Tahun 1835. Kemudian nama *Bacillus subtilis* dikenalkan oleh Ferdinand Cohn pada 1872 (Wikipedia, 2011).

*Bacillus subtilis* merupakan salah satu yang paling banyak digunakan untuk produksi enzim dan bahan kimia khusus. Aplikasi industri termasuk produksi amilase, protease, inosine, ribosides, dan asam amino. Enzim diproduksi oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis* secara luas, bakteri ini dapat memainkan peran dalam pengamanan limbah pembuangan dengan mengikat proton properti dari permukaan (Kastanya, 2008). Gambar *Bacillus subtilis* dapat dilihat pada Gambar 1. Berikut ini adalah klasifikasi *Bacillus subtilis* (Madigan, 2005)

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <b><i>Bacillus subtilis</i></b>



**Gambar 1. *Bacillus subtilis* (Wikipedia, 2011)**

*Bacillus subtilis* memerlukan kondisi optimum untuk tumbuh. Menurut Graumann (2007), kondisi fisika kimia air optimum bagi bakteri ini antara lain:

- 1) Optimum densitas bakteri ini adalah jenis aerob obligat, jika makin tinggi maka makin baik untuk pertumbuhan optimalnya, minimal ialah pada kisaran 2 mg/L;
- 2) Suhu: suhu optimal untuk tumbuh bagi *Bacillus subtilis* adalah antara 25-35°C;
- 3) pH: pH optimal antara 7-8.

Species *Bacillus sp.* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *Bacillus cerus* dan *Bacillus anthracis*, mikroba jenis *Bacillus* tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal, *Bacillus sp.* mampu untuk bertahan pada temperatur tinggi dan kadar garam tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstrasel membuat *Bacillus sp.* merupakan organisme favorit untuk industri. Saat ini *Bacillus subtilis* dipakai sebagai organisme inang untuk studi DNA (Doi, *et. al.*, 1992).

## **2.2 Bakteri Proteolitik**

Enzim proteolitik adalah enzim yang dapat menguraikan atau memecah protein, protein merupakan suatu polimer heterogen dari molekul-molekul asam amino. Enzim proteolitik terbagi atas dua kelompok besar yaitu

golongan eksopeptidase (memecah peptida dari arah luar) dan golongan endopeptidase (memecah peptida dari dalam) (Winarno, 1986).

Enzim proteolitik merupakan enzim yang umum terdapat dalam saluran digesti, enzim ini berfungsi untuk memecah protein menjadi molekul yang lebih kecil sehingga dapat diasimilasi oleh tubuh (Whitaker 1994). Enzim ini merupakan produk yang penting dalam bidang industri. Umumnya, enzim proteolitik diekstraksi dari bakteri karena masa inkubasinya lebih cepat dan produksi enzim tinggi serta biaya untuk kultivasi bakteri lebih murah (Starr 1964). Enzim proteolitik komersial yang dihasilkan oleh mikroba dikategorikan enzim ekstraselular. Enzim ekstraselular adalah enzim yang diproduksi di dalam sel tetapi disekresikan ke luar sel, enzim ekstraselular bagi mikroba berfungsi mengurai bahan makanan yang tidak dapat masuk ke dalam sel menjadi makanan berbobot molekul lebih rendah dan dapat masuk ke dalam sel.

Keberadaan enzim proteolitik dapat diketahui dengan cara melihat ada tidaknya zona bening pada media agar nutrisi skim. Alexander (1977), menjelaskan bahwa zona bening adalah hasil dari pendegradasian protein dalam media tersebut. Isolat yang diharapkan adalah isolat yang memiliki indeks proteolitik yang tinggi, indeks proteolitik didapatkan dari penjumlahan diameter total koloni dengan diameter koloni kemudian dibagi diameter koloni.

Aktivitas proteolitik menghasilkan sedikit penggumpalan, bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler. Dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks daripada pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi, hal ini disebabkan struktur protein yang lebih

kompleks. Mikroorganisme melalui suatu sistem enzim yang kompleks, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Durham, 1987).

Enzim proteolitik bakteri diklasifikasikan berdasarkan 3 kriteria: enzim-enzim yang berada disekitar sel, enzim-enzim yang berada di tempat penyerangan proteolitik, dan memiliki struktur yang sama. Ketiga kelas enzim ini dibentuk berdasarkan tempat enzim; enzim ekstraseluler, ektoenzim, dan enzim intraseluler (Hoffman dan Decho 2000).

Dekomposisi protein lebih sulit dibandingkan pemecahan karbohidrat. Produk akhir dari dekomposisi protein pun lebih bervariasi. Hal ini disebabkan struktur 4 protein yang lebih kompleks. Mikroorganisme dengan sistem enzim yang kompleks, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Abraham, *et. al.*, 1993). Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok yaitu: 1) Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora; 2) Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora; 3) Bakteri anaerobik pembentuk spora.

### **2.3 Enzim Protease**

Protein adalah senyawa organik besar yang mengandung atom karbon, hidrogen, oksigen dan nitrogen. Beberapa diantaranya mengandung sulfur, fosfor, besi atau mineral lain. Protein disusun dari 23 atau lebih unit yang sederhana yang disebut asam amino, artinya protein tersebut mengandung gugus asam atau karboksil ( $-\text{COOH}$ ) dan gugus amino ( $-\text{NH}_2$ ) yang bersifat basa sehingga menyebabkan protein bersifat amfoter yaitu mampu bersifat dan bereaksi sebagai basa dan asam. Dengan demikian protein mempunyai mekanisme untuk mencegah perubahan pH yang tiba-tiba di dalam tubuh (Winarno, 1993).

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

Protease adalah enzim yang memutuskan ikatan peptida pada protein. Berdasarkan tempat pemutusan ikatan peptida, enzim protease dibagi menjadi dua yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase ialah enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan peptida pada bagian dalam rantai polipeptida, sedangkan enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan peptida pada ujung-ujung rantai polipeptida disebut eksopeptidase. Berdasarkan gugus aktif dan gugus fungsinya, enzim protease dibedakan menjadi empat golongan yaitu: protease serin, protease tiol, protease karboksil, dan protease logam (Murray, *et.al.*, 2003).

Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan dan mikroorganisme. Enzim dari mikroorganisme mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya adalah harganya lebih murah, mutunya lebih seragam, produktivitasnya lebih mudah ditingkatkan, dapat diproduksi dalam jumlah besar, mikroba penghasil enzim dapat ditumbuhkan dengan cepat serta isolasi enzim relatif lebih mudah (Winarno, 1986).

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 mikroorganismenya pada media fermentasi selama pertumbuhannya sedangkan peptidase didapat hanya bila sel mengalami autolisis (Muchtadi, *et. al.*, 1992).

#### 2.4 Isolasi Bakteri

Menurut Hidayat, *et. al.*, (2006), tahap pertama dalam penapihan mikroba yang potensial untuk diterapkan dalam industri adalah isolasi. Isolasi meliputi mendapatkan, memurnikan, identifikasi, dan pengujian produksi, tahap berikutnya adalah melakukan seleksi, yang biasanya menggunakan tes sederhana atau menggunakan medium spesifik dengan substrat tertentu. Pengetahuan teori tentang organisme yang paling baik untuk suatu produk akan sangat membantu dalam memperoleh isolat yang diharapkan, medium yang diharapkan adalah medium yang memungkinkan isolat dapat tumbuh dengan baik dan memberikan penampakan bahan genetik yang maksimum. Isolat yang diperoleh kemudian dimurnikan dan ditumbuhkan pada media padat, sebagai kultur sediaan digunakan media agar miring. Isolat yang diperoleh harus diuji terlebih dahulu terhadap kemampuan membuat produk yang diharapkan, senyawa-senyawa penghambat dan pemacu pertumbuhannya, kondisi lingkungan yang diharapkan untuk tumbuh dan berproduksi secara optimum dan sebagainya.

Selain pemilihan sumber isolat, hasil yang akan diperoleh juga bergantung pada metode dan kondisi yang digunakan dalam isolasi, seperti komposisi dan pH medium (Ogrydziak 1993). Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium yang mengandung kasein, yang merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease dan menginduksi sintesis enzim protease alkalin (Fujiwara dan Yamamoto 1987).

## 2.5 Isolasi Bakteri Proteolitik

Seluruh tahap inkubasi pada proses isolasi dan seleksi dilakukan pada suhu tinggi (50°C). Kombinasi pH dan suhu tinggi ini dimaksudkan agar bakteri proteolitik yang terjaring adalah penghasil enzim protease yang memiliki aktivitas optimum dan stabilitas tinggi pada pH dan suhu tinggi (Fardiaz, 1993).

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

Kebanyakan bakteri dapat memecah protein menjadi peptida dan asam-asam amino, dan menggunakannya untuk sumber energi atau untuk sintesis protein kembali. Untuk mengisolasi bakteri proteolitik digunakan medium yang mengandung kasein, yaitu *Skim Milk Agar*. Pertumbuhan koloni mikroba yang memecah protein (bersifat proteolitik) pada *Skim Milk Agar* akan dikelilingi areal bening. Untuk membedakan antara areal bening yang disebabkan oleh koloni

pembentuk asam dengan koloni proteolitik, di atas medium ditambahkan HCl 1% atau asam asetat 10%. Areal di sekeliling koloni proteolitik akan tetap bening, sedangkan areal di sekeliling koloni pembentuk asam akan keruh kembali karena terjadinya koagulasi kasein oleh asam (Fardiaz, 1993).

## 2.6 Karakterisasi Bakteri Proteolitik

Enzim proteolitik adalah enzim yang dapat menguraikan atau memecahkan protein. Protease termasuk ke dalam kelas utama enzim hidrolase yang mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis. Enzim proteolitik atau protease mempunyai dua pengertian, yaitu proteinase yang mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih sederhana, dan peptidase yang menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Enzim proteolitik yang berasal dari mikroorganisme adalah protease yang mengandung proteinase dan peptidase (Frazier, Westhoff 1983).

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

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 dimana pertumbuhan akan tampak. Pertumbuhan terbaik agak berada dalam jarak terbatas yang disebut suhu optimum. Suhu optimum bagi pertumbuhan spesies mikroba adalah hubungan terbaik dengan suhu habitat asli organisme (Seeley dan Vandemark, 1962).

## 2.7 Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan diindikasikan dengan peningkatan jumlah sel baik ukuran, berat, maupun volume sel tunggal atau koloni. Hal ini tergantung pada kemampuan sel membentuk protoplasma baru dari nutrisi yang dapat digunakan di lingkungannya. Pada beberapa bakteri, pertumbuhan meliputi peningkatan kromosom bakteri, sintesis dinding sel baru dan membran plasma, pemisahan dua kromosom, pembentukan septa dan bagian-bagian sel. Proses reproduksi aseksual ini disebut pembelahan biner. Pada pembelahan biner, setiap meningkat ukurannya dan membelah menjadi dua sel. Interval waktu yang dibutuhkan sel bakteri atau populasi sel untuk membelah atau menggandakan diri disebut waktu generasi (Diaz, 2003).

Kurva pertumbuhan bakteri diperlukan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan bakteri, sehingga dapat diketahui fase yang tepat saat hidrogen terbentuk. Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan metode Turbidimetri. Prinsip dasar Turbidimetri adalah jika cahaya mengenai sel, maka cahaya dipantulkan sedangkan cahaya yang tidak mengenai sel akan diteruskan. Jumlah cahaya yang diteruskan berbanding lurus dengan transmittansi, sedangkan cahaya yang dipantulkan berbanding lurus dengan absorbansi (berbanding terbalik dengan transmittansi). Kurva pertumbuhan digunakan untuk melihat jumlah bakteri yang ada berdasarkan kekeruhannya pada media. Kekeruhan ini diukur densitas

optiknya pada panjang gelombang 660 nm ( $\lambda=660$  nm) dan menggunakan larutan blanko aquadest steril. Pertumbuhan bakteri menggunakan pengukuran densitas optik dapat didefinisikan ke dalam jumlah bakteri (biomassa). Hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh (Kambourova *et al.*, 1995 dalam Amelia dan Surya, 2011).

Menurut Abedon, 2003 dalam Diaz, 2003, media segar yang diinokulasi dengan sejumlah sel bakteri dan ditumbuhkan pada periode waktu tertentu akan menggambarkan data yang akan menghasilkan tipikal kurva pertumbuhan bakteri yang meliputi 4 fase yaitu fase lamban, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian. Fase karakteristik siklus pertumbuhan bakteri yang dikenali ada 4 yaitu: 1) Fase log. Disebut juga fase lamban, segera terjadi setelah inokulasi sel ke dalam medium segar dan populasi untuk sementara tanpa perubahan. Walaupun tidak ada perubahan sel yang nyata terjadi, sel mungkin tumbuh dalam jumlah volume dan massa, sintesis enzim, protein, asam ribonukleat dan peningkatan aktivitas metabolisme. Panjang fase log tergantung pada faktor yang sangat bervariasi termasuk ukuran dari inokulum, waktu yang diperlukan untuk pulih dari guncangan atau kerusakan fisik saat pemindahan, dan waktu yang diperlukan untuk sintesa koenzim baru yang diperlukan untuk metabolisme substrat yang ada didalam medium; 2) Fase eksponensial. Tahap pertumbuhan yang bersifat eksponensial adalah suatu pola pertumbuhan yang seimbang yaitu semua sel sedang membagi secara teratur dengan cara pembelahan biner dan tumbuh dengan pola progresif geometris; 3) Fase tetap/statis. Pertumbuhan populasi bakteri terbatas oleh salah satu dari 3 faktor yaitu tersedianya nutrisi, akumulasi dari metabolit penghambat atau hasil akhir dan tersedianya ruang. Sepanjang fase statis, jika sel hidup dihitung, tidak bisa ditentukan apakah beberapa sel mengalami kematian dan beberapa sel sedang membelah atau populasi sel telah berhenti dan membelah; 4) Fase kematian. Setelah populasi

mengalami fase statis, fase kematian kemudian terjadi yaitu jumlah populasi sel hidup menurun, sepanjang fase kematian, jumlah sel hidup terus berkurang secara progresif geometris yang merupakan kebalikan dari fase eskponensial.

### 2.7.1 Analisa Gravimetri

Gravimetri merupakan salah satu metode analisis kuantitatif suatu zat atau komponen yang telah diketahui dengan cara mengukur berat komponen dalam keadaan murni setelah melalui proses pemisahan. Analisa gravimetri adalah proses isolasi dan pengukuran berat suatu unsur atau senyawa tertentu. Bagian terbesar dari penentuan secara analisis gravimetri meliputi transformasi unsur atau radikal ke senyawa murni stabil yang dapat segera diubah menjadi bentuk yang dapat ditimbang dengan teliti. Metode gravimetri memakan waktu yang cukup lama, adanya pengotor pada konsitituen dapat diuji dan bila perlu faktor-faktor koreksi dapat digunakan (Khopkar, 2002).

Metode yang biasa digunakan pada pemisahan adalah: 1) Pembentukan endapan yang sukar larut, lalu endapan disaring, dicuci, dikeringkan atau dipijar kemudian ditimbang; 2) Metode penyulingan. Metode ini memanfaatkan sifat volatilitas dari suatu zat kemudian hasil reaksi ditampung dan ditimbang atau berkurang berat cuplikan karena penyulingan dapat diukur; 3) Metode elektrolisis dengan mengendapan suatu logam yang murni pada katoda. Analisa gravimetri dapat berlangsung dengan baik, jika persyaratan berikut ini dapat terpenuhi: komponen yang ditentukan harus dapat mengendap secara sempurna serta endapan yang dihasilkan stabil dan sukar larut, endapan yang terbentuk harus dapat dipisahkan dengan mudah dari larutan (dengan penyaringan), endapan yang ditimbang harus mempunyai susunan stoikiometrik tertentu (dapat diubah menjadi sistem senyawa tertentu) dan harus bersifat murni atau dapat dimurnikan lebih lanjut (Fatimah, 2005).

Analisis Gravimetri merupakan analisis kimia secara kuantitatif berdasarkan proses pemisahan dan penimbangan suatu unsur atau senyawa tertentu dalam bentuk yang semurni mungkin, Metode Gravimetri untuk analisa kuantitatif didasarkan pada stokiometri reaksi pengendapan dan endapan yang terbentuk berupa padatan, dengan kelarutan yang tinggi, kemurnian yang tinggi, mempunyai susunan yang tetap, dan kristal-kristal yang kasar yang kemudian disaring, dikeringkan dan terakhir ditimbang, pemisahan dalam analisa Gravimetri dapat dilakukan dengan pemijaran bersuhu tinggi, penyulingan dan elektrolisis. Sedangkan prinsip analisa Gravimetri adalah tidak menggunakan indikator karena terjadi pengendapan dengan pemijaran dan terjadi perubahan warna sampel (Murray, *et. al.*, 2003).

### **2.7.2 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).

Turbiditas dapat diukur menggunakan alat *Photometer* (penerusan cahaya), semakin pekat atau semakin banyak populasi mikroba maka cahaya yang diteruskan semakin sedikit. Turbiditas juga dapat diukur menggunakan Spektrofotometer (*Optical Density / OD*), yang sebelumnya dibuat kurva standart berdasarkan pengukuran jumlah sel baik secara total maupun yang hidup saja atau berdasarkan berat kering sel. Unit *photometer* atau OD proporsional dengan massa sel dan juga jumlah sel, sehingga cara ini dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah atau massa sel secara tidak langsung (Schlegel, 1994).

### 2.7.3 Analisa Perhitungan Langsung

Analisa perhitungan langsung yaitu menghitung jumlah bakteri secara langsung yang dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil, alat yang digunakan adalah *Haemocytometer*. Jumlah cairan yang terdapat antara *coverglass* 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 mm<sup>2</sup>. 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, 2011).

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 (Iqbalali, 2008).

#### 2.7.4 Pengujian Aktivitas Protease

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

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. 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.

## 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).

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

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease ini terdiri dari bakteri *Bacillus subtilis* 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*,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5M didapatkan dari Panadia Laboratory, Jalan Taman Sulfat X/16-27 Malang. Kertas saring Whatman no. 42, pereaksi folin,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5M, buffer fosfat 0,01M, HCl 0,05M,  $\text{CaCl}_2$  2mmol/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, 100mL dan 250 mL merk Pyrex, gelas ukur 25 mL, 50 mL dan 100 mL merk Pyrex, beaker glass 100mL dan 250 mL merk Pyrex, spatula, mikro tub 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, spektrofotometer merk Thermo Spectronic, haemocytometer sertamikroskop merk Olympus.

### 3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksploratif, dimana metode ini digunakan untuk mempelajari gejala-gejala serta studi kasus yang masih perlu diteliti dan masih sangat kurang diketahui oleh masyarakat umum. Penelitian jenis ini bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai suatu gejala tertentu, atau mendapatkan ide-ide baru dengan maksud untuk merumuskan masalahnya secara lebih terperinci atau untuk mengembangkan hipotesa. Metode ini bertujuan untuk memformulasikan pertanyaan penelitian yang lebih tepat, sehingga hasil penelitian nanti dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan selanjutnya di masa mendatang (Yumei dan Yulia, 2008).

Peneliti mencoba untuk menggambarkan dan menjelaskan tentang isolasi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin untuk mengetahui karakterisasi aktivitas enzim proteolitik *Bacillus subtilis* dengan penentuan suhu optimum, pH optimum, waktu inkubasi serta konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dan kecepatan maksimal ( $V_{maks}$ ).

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Pembuatan Kultur Stok Isolat

Pembuatan kultur stok isolat menggunakan metode Downes dan Ito (2001). Media yang digunakan dalam pembuatan kultur stok bakteri *Bacillus subtilis* adalah NA (*Nutrient Agar*) dan casein sebanyak 5 mL, larutan tersebut dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dipanaskan supaya tercampur merata. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit, 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 diinkubasi pada inkubator dengan suhu ruang yaitu 37°C selama 24 jam. Media diambil 1 loop isolat bakteri *Bacillus subtilis* secara aseptis yang didapat dari penelitian sebelumnya pada media NA dengan metode

gores secara zig-zag. Kultur stok disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Peremajaan isolat dilakukan secara rutin tiap 2 minggu (Fatimah, 2005).

### 3.3.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*

Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* menggunakan metode Kosim dan Putra (2009). Langkah awal dalam pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dengan mengambil bakteri *Bacillus subtilis* sebanyak 1 ose dari stok biakan bakteri, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 1 mL larutan Na-fis 0,9% dan dibandingkan dengan Mc. Farland ( $10^5 = 1500 \times 10^6$  mL). 1 mL Na-fis 0,9% yang ditambah bakteri *Bacillus subtilis* terlihat lebih keruh dari Mc. Farland sehingga ditambahkan lagi larutan Na-fis 0,9% sampai volumenya mencapai  $\pm 3$  mL. Setelah tingkat kekeruhan larutan Na-fis 0,9% yang didalamnya terdapat bakteri *Bacillus subtilis* sama dengan Mc. Farland, diambil 1 mL sebagai starter. Media dimasukkan ke dalam 100 mL media *Nutrient broth* (NB) yang mengandung 1 gr casein dan fenol folin 10 ml, kemudian media diinkubasi dalam *shaker incubator* pada kecepatan 120 rpm suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, selanjutnya diambil setiap 2 jam sekali, dengan 3 perhitungan yaitu: Gravitimetri dengan kertas saring, *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan 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 gravimetric 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 (Kosim dan putra, 2009)**

Perhitungan gravimetri dengan kertas saring 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 sebanyak 5 ml, dilakukan penyaringan untuk memisahkan substrat dan endapan serta kertas saring dikeringkan lagi dan dihitung sebagai berat akhir. Langkah-langkah analisa gravimetri dapat dilihat pada Lampiran 8.

#### **3.3.2.2 Analisa *Optical Dencity* (OD)(Kosim dan putra, 2009)**

Pada perhitungan *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer panjang gelombang 660 nm 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 subtilis* dengan media *Nutrient broth* (NB), diambil sebanyak 3 ml kemudian didiamkan selama 5 menit dan dihitung nilai absorbansinya dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

Analisa optical densitas menggunakan metode spektrofotometer, salah satu contoh instrumentasi analisis yang lebih kompleks adalah spektrofotometer. Langkah-langkah analisa *optical dencity*(OD) dapat dilihat pada Lampiran 9.

### 3.3.2.3 Analisa Perhitungan Langsung (Kosim dan putra, 2009)

Perhitungan langsung menggunakan metode haemocytometer. Metode ini dapat dihitung secara langsung, penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Tahap awal yang dilakukan adalah hasil dari media *Nutrient broth* (NB) dengan bakteri *Bacillus subtilis* setelah di *shaker*, diambil 1 ml dengan menggunakan mikropipet, didiamkan beberapa saat sampai media merata, dan 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*)

Produksi enzim dapat dilakukan dengan mengisolat bakteri proteolitik yang telah didapatkan dari fase log yang dilihat dari kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* selama 24 jam dan pada penelitian ini menggunakan metode Sumardi dan Lengkana (2009). Diambil 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. Kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no. 42 dan diambil substratnya, diinkubasi selama 24 jam pada inkubator suhu 37°C. Media 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 menggunakan metode Walter (1984). Langkah kerja dalam pengujian aktivitas protease dengan menggunakan spektrofotometer sebagai berikut: Buffer fosphat 0,01 M sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing *blanko*, *standar*, *sampel*, kemudian ditambahkan substrat kasein 20 mg/mL sebanyak 0,5 mL, tabung reaksi yang berisi *sampel* ditambahkan enzim sebanyak 0,1 mL, tabung reaksi yang berisi standar ditambahkan tirosin standar sebanyak 5  $\mu\text{mol/mL}$ , dan tabung reaksi yang berisi *blanko* ditambahkan akuades sebanyak 0,1 mL, kemudian ketiga tabung tersebut divorteks dan diinkubasi di *shaker incubator* selama 10 menit dengan suhu 37°C.

Setelah waktu inkubasi ditambahkan TCA 5% pada semua tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 mL, tabung reaksi yang berisi *sampel* dimasukkan akuades sebanyak 0,1 mL, pada tabung reaksi yang berisi *blanko* serta *standar* ditambahkan enzim masing-masing sebanyak 0,1 mL. Ketiga tabung tersebut divorteks dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi ketiga tabung reaksi tersebut disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm, masing-masing filtrat diambil sebanyak 0,75 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi yang baru. Filtrat yang baru dipindahkan, ditambahkan dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  masing-masing sebanyak 2,5 mL serta ditambahkan fenol folin masing-masing sebanyak 0,5 mL, kemudian ketiga tabung reaksi divorteks dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

#### 3.3.4.1 Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease

Penentuan suhu optimum enzim protease menggunakan metode Walter (1984). Metode ini menggunakan variasi suhu yaitu: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan 70°C, suhu-suhu tersebut diambil variasinya mulai dari minimum sampai

maksimum yaitu 20°C dan 40°C serta 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). Penentuan pH optimum enzim protease menggunakan *buffer Sitrat* untuk pH 4, pH 5 dan pH 6 serta *buffer Tris HCl* untuk pH 7, pH 8 dan pH 9, beberapa pH tersebut diambil variasinya yaitu pada kisaran 7,0 yaitu 5, 6, 7, 8, dan 9. Langkah-langkah penentuan pH optimum enzim protease dapat dilihat pada Lampiran 5.

#### 3.3.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Enzim Protease

Penentuan waktu inkubasi enzim protease menggunakan metode Walter (1984). Penentuan waktu inkubasi enzim protease 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.

#### 3.3.5 Penentuan $V_{maks}$ dan $K_m$ (Penentuan Michaelis-Menten)

Penentuan  $V_{maks}$  dan  $K_m$  (penentuan Michaelis-Menten) menggunakan metode Walter (1984) dalam Susanti (2003). Prinsip dari metode 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, sedangkan penentuan rumus nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  ditentukan dari grafik *plot Lineweaver-Burk* laju reaksi enzim (maksimum)

terhadap konsentrasi substrat. Langkah-langkah penentuan  $V_{maks}$   $K_m$  dapat dilihat pada Lampiran 7.

Prosedur kerja yaitu: pembuatan sampel, 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, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 2 mL TCA dan 0,2 mL  $CaCl_2$  2mmol/L, didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C, 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-phenolciocalteu, didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm.

Pembuatan blanko, sebanyak 1 mL buffer fosfat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCl 0,05 mol/L dan 0,2 mL aquades dicampurkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, setelah 10 menit larutan ditambahkan 2 mL TCA 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, sebesar 1,5 mL supernatannya dicampur dengan 5 mL  $Na_2CO_3$  dan 1 mL pereaksi folin-phenolciocalteu, larutan didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 578 nm.

Yang terakhir pembuatan standar, sebanyak 1 mL buffer fosfat, 1 mL buffer kasein, 0,2 mL HCl 0,05 mol/L dan 0,2 mL tirosin standar dicampurkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah 10 menit larutan ditambahkan 2 mL TCA 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, sebanyak 1,5 mL supernatan dicampur dengan 5 mL  $Na_2CO_3$  dan 1 mL pereaksi folin-phenolciocalteu, larutan

didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

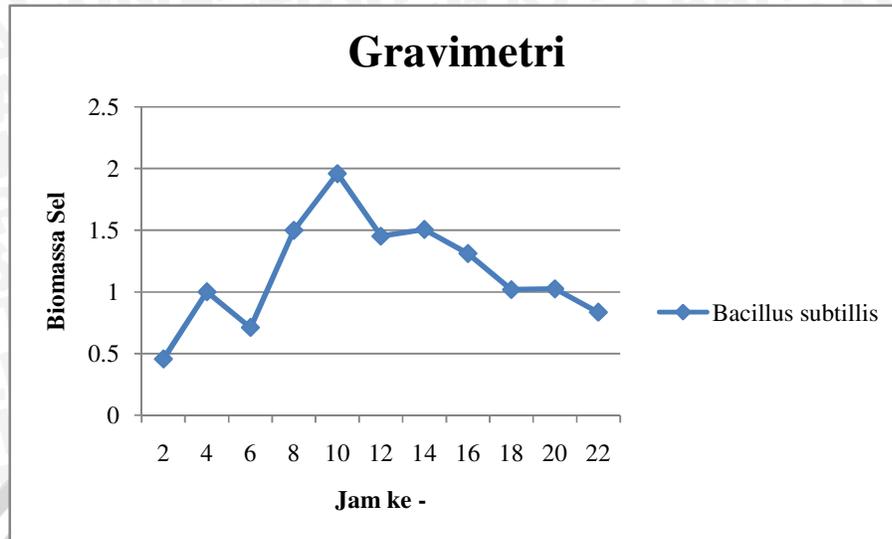
### 4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Data kurva pertumbuhan dibuat dengan biakan pada media padat kemudian bakteri diinokulasi pada media cair yang digunakan sebagai kultur awal, dalam hal ini, sel *Bacillus subtilis* 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.

Kultur awal media cair ini bertujuan untuk menyeragamkan usia bakteri dari biakan padat. Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* diperoleh dengan 3 metode yaitu metode hitungan langsung, metode gravimetri, dan metode turbidimetri, yaitu melihat jumlah *Bacillus subtilis* dengan mengukur densitas optik pada panjang gelombang 660 nm ( $OD_{660}$ ). Tujuan dari pembuatan kurva dengan tiga metode yang berbeda ini adalah untuk membandingkan dan mencari hasil yang terbaik berdasarkan kurva tersebut, sehingga selanjutnya akan dilakukan isolasi protease dari fase log *Bacillus subtilis*.

#### 4.1.1 Kurva Pertumbuhan (Metode Gravimetri)

Metoda gravimetri adalah suatu metoda analisis secara kuantitatif yang berdasarkan pada prinsip penimbangan, dalam analisa gravimetri yang dihitung adalah bagian berat dari zat yang dianalisa yang terdapat dalam sampel. Untuk mengetahui berat biomassa sel bakteri *Bacillus subtilis* pada analisa gravimetri dilakukan penguapan dengan menggunakan oven bersuhu 80°C sehingga permukaan kertas saring dapat menguap maksimal. Berdasarkan analisis biomassa sel menggunakan metode Gravimetri, diperoleh garfik yang dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2. Hasil Analisa Gravimetri Dengan Kertas Saring**

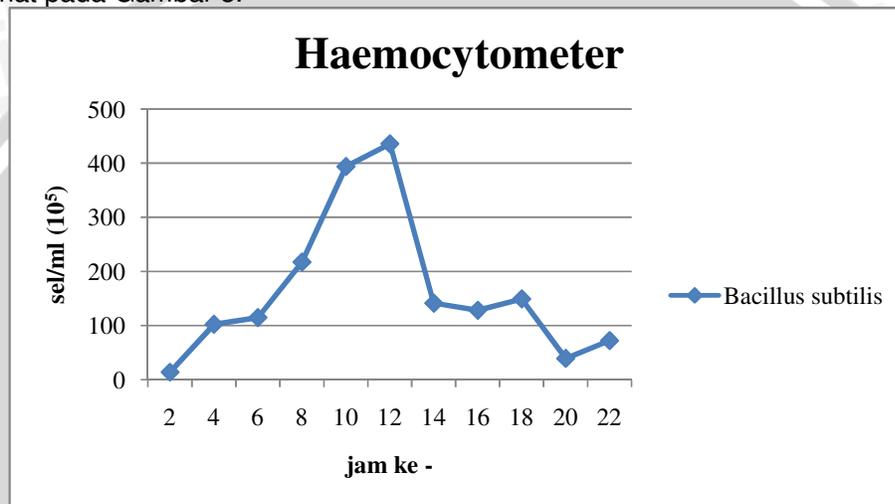
Dari kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* pada Gambar 2, dapat dilihat bahwa *Bacillus subtilis* melakukan adaptasi pada fase lag selama  $\pm 6$  jam. Waktu adaptasi ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan media *starter* untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan media produksi, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen, karena transter ini hanya bertujuan untuk menghomogenkan umur bakteri agar seragam.

Setelah mengalami fase adaptasi, maka bakteri akan memasuki fase log. Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya. Oleh karena itu, pada fase ini bakteri banyak memproduksi zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya. Pada penelitian ini, fase log bakteri terjadi pada jam ke-8 hingga jam ke-10 dengan biomassa sel 1,9595%, fase selanjutnya adalah fase kematian dimana sampai jam ke-22 pertumbuhan berkurang bahkan hampir tidak terjadi pertumbuhan pada bakteri.

#### 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 3.

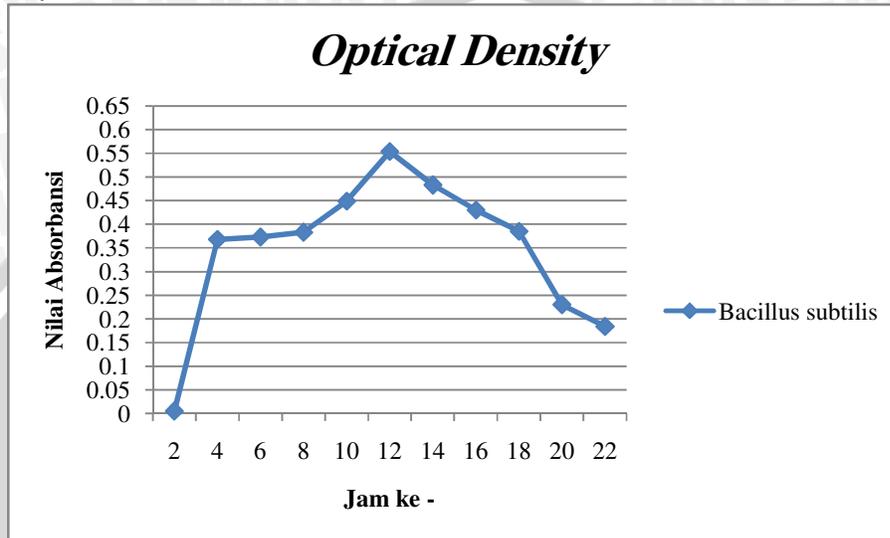


Gambar 3. Hasil Analisa Haemocytometer

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* pada Gambar 3, dapat dilihat bahwa *Bacillus subtilis* mengalami fase adaptasi kemudian bakteri akan memasuki fase log, sedangkan 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  $436 \times 10^5$  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 4.



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

Dari kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa *Bacillus subtilis* melakukan adaptasi pada fase lag ini dapat dikatakan cukup lama. Hal ini dikarenakan media starter untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan media produksi, akibatnya usia sel relatif seragam atau homogen, setelah mengalami fase adaptasi bakteri akan memasuki fase log. Pada penelitian ini, fase log bakteri terjadi pada jam ke-10 hingga jam ke-12 dengan nilai absorbansi 0.554.

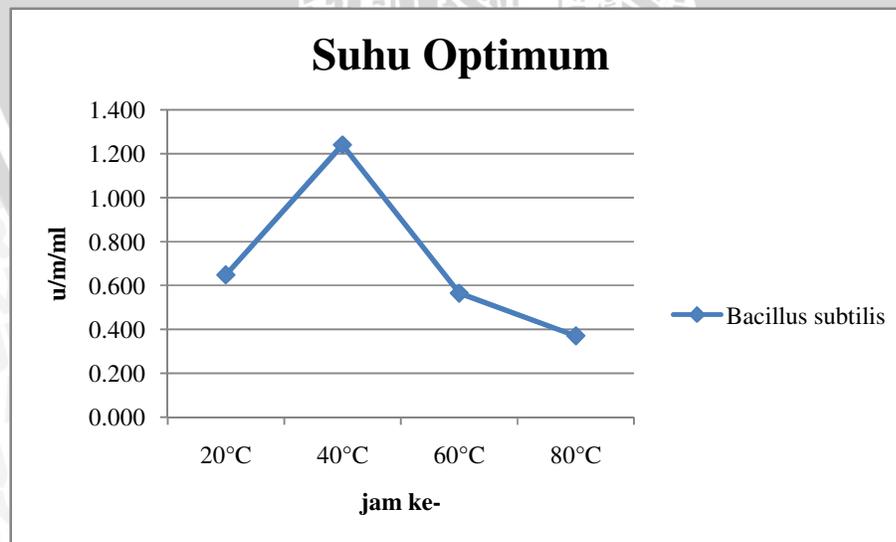
Pengamatan terhadap kurva pertumbuhan juga telah dilakukan oleh Kosim dan Putra (2009), dimana fase log dimulai pada jam ke-5 hingga jam ke-13, dikarenakan medium yang digunakan oleh Kosim dan Putra berbeda dengan medium yang digunakan pada penelitian ini. Selain itu juga, panjang gelombang yang digunakan 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. 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.

Dari ketiga metode yang digunakan didapatkan data yang berbeda, dimana metode yang baik digunakan adalah metode *Haemocytometer* dan metode *Optical density* (OD) yaitu fase log terjadi pada jam ke-10 sampai jam ke-12, sedangkan pada metode Gravimetri yaitu fase log terjadi pada jam ke-8 sampai jam ke-10. Metode yang saya gunakan adalah metode *Optical density* (OD) karena lebih teliti dengan menggunakan alat spektrofotometer.

#### 4.2 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan Suhu

Analisa yang dilakukan pada perlakuan suhu ini menggunakan empat suhu yang berbeda yaitu 20°C, 40°C, 60°C, 80°C dengan 2 kali pengulangan. Data hasil analisa perlakuan suhu dapat dilihat Gambar 5.



Gambar 5. Aktivitas Protease Pada Variasi Suhu

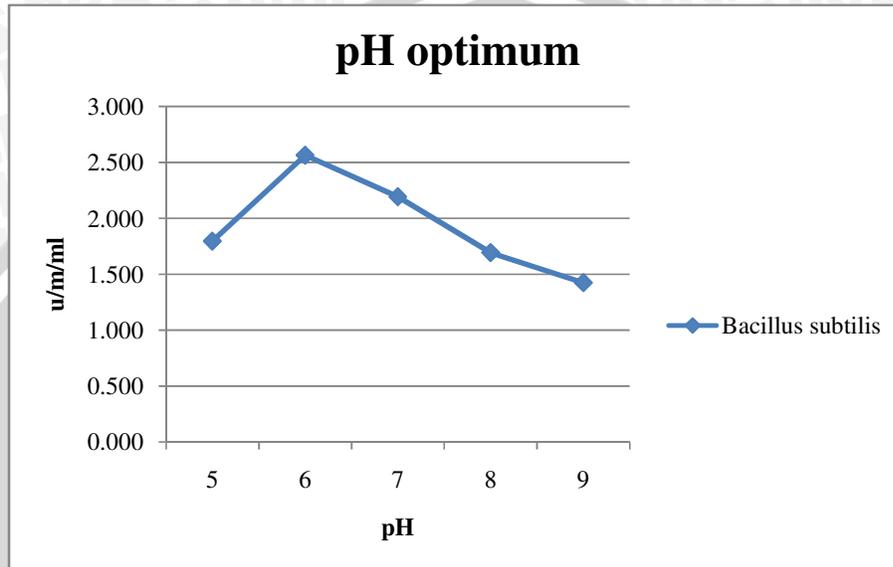
Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan didapatkan aktivitas enzim optimum pada suhu 40°C yaitu sebesar 1,241 Unit/m/mL. Bakteri *Bacillus subtilis* ini mampu menghasilkan enzim protease dengan maksimum pada suhu 40°C, sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri ini merupakan bakteri termofilik yang mampu tumbuh pada suhu 40°C-70°C.

Penelitian lain yang dapat dijadikan pembeda dengan penelitian ini adalah penelitian yang dilakukan oleh Sugiyono (2002), dari isolat *Basillus sp.* suhu optimum yang dicapai pada suhu 60°C dengan aktivitas sebesar 0,115 U/m/ml. Aktivitas enzim mulai menurun setelah suhu 60°C, mungkin karena sebagian protein telah mengalami kerusakan atau terdenaturasi. Apabila suhu lingkungan disekitar enzim meningkat maka akan menyebabkan putusnya ikatan hidrogen sehingga struktur enzim berubah, akibatnya aktivitasnya menurun. Pada suhu 70°C menunjukkan bahwa enzim masih mempunyai aktivitas sebesar 0,084 U/m/ml dan pada suhu 80°C enzim telah kehilangan aktivitasnya. Pada suhu yang melebihi suhu optimum pertumbuhan bakteri, dapat terjadi kerusakan struktur protein dan DNA yang memegang peranan kunci dalam metabolisme dan pertumbuhan sel (Suhartono, 1989).

Pengamatan terhadap suhu optimum bakteri protease yang telah dilakukan oleh Grata, *et. al.*, (2003) menunjukkan hasil yang berbeda tetapi masih menggunakan bakteri *Bacillus sp.* Hasil penelitian menunjukkan nilai aktivitas protease tertinggi pada perlakuan suhu 60°C sebesar 11,44 µmol dengan menggunakan media casein. Didapatkan hasil yang berbeda 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.

#### 4.3 Hasil Analisa Aktivitas Protease Pada Perlakuan pH

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



Gambar 6. Aktivitas Protease Pada Variasi pH

Dari hasil pengamatan didapatkan rata-rata aktivitas enzim tertinggi pada pH 6 yaitu sebesar 2,565 Unit/m/mL. Bakteri *Bacillus subtilis* ini 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.

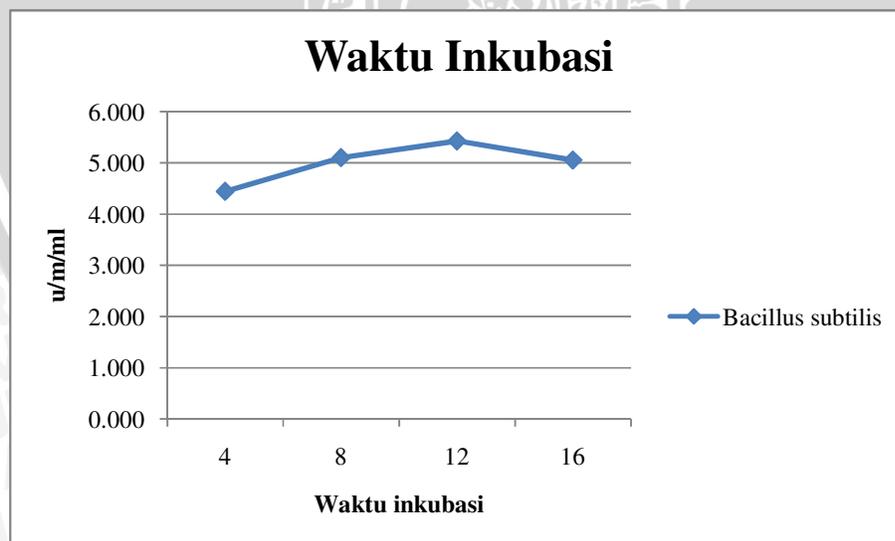
Penelitian lain yang dilakukan oleh Sugiyono (2002), dari isolat *Basillus sp.* untuk mengamati stabilitas pH enzim dilakukan dengan cara mendingkan enzim pada taraf pH yang diujikan, yaitu pH 6, 7, dan 8 selama waktu tertentu dimana pada pH 6 enzim lebih stabil setelah didiamkan selama 180 menit dengan aktivitas enzim sebesar 0,136 U/ml, pada pH 7 enzim lebih stabil setelah didiamkan selama 240 menit dengan besar aktivitas enzim 0,259 U/ml, dan pada

pH 8 enzim cenderung mengalami penurunan secara cepat dengan aktivitas enzim sebesar 0,137 U/ml. pada menit ke-60. Aktivitas protease terbesar dan stabil pada perlakuan stabilitas pH 7 sebagaimana pH optimum enzim.

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, dengan demikian dapat dikatakan bahwa pH merupakan salah satu faktor yang memiliki potensi untuk mempengaruhi aktivitas enzim, serta sangat erat kaitannya dengan fungsi aktif enzim, kelarutan substrat, dan ikatan enzim-substrat (Pelczar dan Chan, 1986).

#### 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 7.



Gambar 7. Aktivitas Protease Pada Variasi Waktu inkubasi

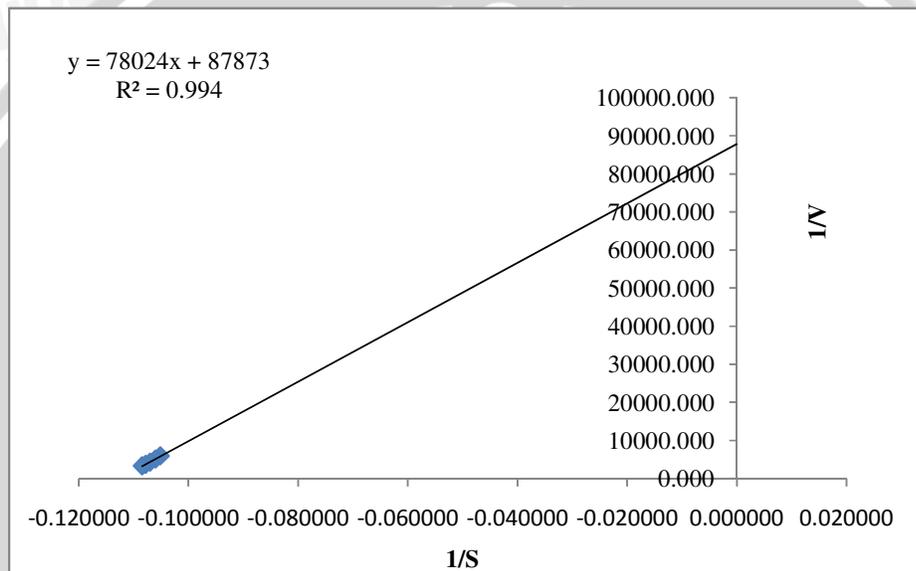
Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan didapatkan aktivitas enzim optimum pada waktu inkubasi 12 jam yaitu sebesar 5,426 Unit/m/mL. Bakteri *Bacillus subtilis* ini mampu menghasilkan enzim protease dengan maksimum pada waktu inkubasi 12 jam karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah bertimbun dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri. Perbedaan waktu karena perbedaan media pertumbuhan yang digunakan yaitu media LB (*Luria Bertani*) tetapi tetap menggunakan substrat casein. Bakteri *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan enzim protease dengan maksimum pada waktu inkubasi 12 jam karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah tertimbun dalam medium, sehingga mengganggu 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.

Penelitian yang dilakukan oleh Widhyastuti (2002). Produksi protease oleh bakteri isolat *Basillus sp.* dimulai setelah inkubasi jam ke-6, aktivitas protease meningkat dengan semakin lamanya waktu inkubasi sampai mencapai maksimal inkubasi pada jam ke-14, selanjutnya produksi protease relative konstan sampai inkubasi jam ke-22 kecuali pada jam ke-18 dimana inkubasi sedikit mengalami penurunan.

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 (Priest, 1984).

#### 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, nilai  $K_m$  yang kecil menunjukkan ikatan antara enzim dan substrat kuat dan nilai  $K_m$  yang besar menunjukkan ikatan antara enzim dan substrat lemah (Urtati, 2009). Grafik dari penentuan  $V_{maks}$  dan  $K_m$  dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8.  $V_{maks}$  dan  $K_m$

Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  pada protease bakteri *Bacillus subtilis* adalah  $0.0114 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  dan  $887,9178 \text{ mM}$ , nilai ini dapat menjelaskan bahwa pada kelajuan yang maksimum ( $V_{max} = 0,0114 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), semua sisi aktif enzim akan berikatan dengan substrat, dan jumlah kompleks E-S (Enzim Substrat) adalah sama dengan jumlah total enzim yang ada, serta Nilai  $K_m$  yang didapat sebesar  $887,9178 \text{ mM}$  dimana nilai ini dapat menunjukkan seberapa kuatnya pengikatan substrat ke enzim. Perhitungan penentuan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  dapat dilihat pada Lampiran 11.

Dapat dibandingkan dengan penelitian Putranto (2006) yaitu pada *Lactobacillus* yang memiliki  $V_{maks}$  sebesar  $28,6 \text{ mM min}^{-1}$  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 lambat atau terhambat (Ketaren, 1990).

Pembentukan kompleks enzim substrat membatasi kecepatan reaksi enzimatik. Kecepatan maksimum reaksi enzimatik dicapai pada tingkat konsentrasi substrat yang sudah mampu mengubah seluruh enzim menjadi kompleks enzim substrat. Pada konsentrasi substrat di bawah konsentrasi ini, reaksi enzimatik bergantung pada konsentrasi yang ditambahkan, sedangkan pada konsentrasi substrat di atas konsentrasi tersebut kecepatan reaksi menjadi tidak tergantung pada konsentrasi substrat (Suhartono, 1989).



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Karakteristik aktivitas protease bakteri *Bacillus subtilis* dari isolat ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin memiliki fase log pada jam ke-12 dengan dengan nilai absorbansi 0.554, suhu optimum enzim protease pada suhu 40°C dengan jumlah bakteri sebesar 1,241 U/menit/mL, pH optimum pada pH 6 dengan dengan jumlah bakteri sebesar 2,565 U/menit/mL, waktu inkubasi pada jam ke-12 dengan jumlah bakteri sebesar 5,426 U/menit/mL, dan mempunyai nilai  $V_{maks}$  sebesar 0.0114 mM L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> dan  $K_m$  sebesar 887,9178 mM.

### 5.2 Saran

Disarankan perlu adanya penelitian mengenai purifikasi enzim protease *Bacillus subtilis* dari isolasi ikan teri (*Stoleporus spp.*) asin serta perlu adanya penelitian yang sama tetapi menggunakan metode berbeda agar dapat dijadikan sebagai pembanding dengan penelitian sebelumnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham A. G., G. Antoni L., and Añon A. C., 1993. **Proteolytic Activity of *Lactobacillus bulgaricus* Grown in Milk**, Journal of Dairy Science . La Plata, Argentina
- Alexander M. 1971. **Microbial Ecology**. New York: John Wiley & Sons, Inc
- Amelia, R dan Surya R. P. 2011. **Identifikasi Biohidrogen dari Kultur Campuran Menggunakan Variasi Konsentrasi Sukrosa Sebagai Substrat**. Jurusan Kimia-FMIPA. ITS : Surabaya
- Bambang Purnomo, 2004. **Bahan Kuliah Dasar-dasar Mikrobiologi**. IPB. Bogor
- Diaz, Lepsi Putri. 2003. **Karakteristik Morfologi dan Kurva Pertumbuhan *bacillus sp.*** Fakultas Kedokteran Hewan. IPB : Bogor
- Downes, F. P. and K. Ito. 2001. **Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Food**. American Public Health Association. Washington, D. C.
- 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 Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor
- Fatimah, S dan Yoskasih O. 2007. **Penentuan Kadar Air Dalam Serbuk Uo2 Dengan Metoda Gravimetri**. Hasil-hasil Penelitian EBN Tahun: ISSN 0854-5561
- Frazier WL, Westhoff DC. 1983. **Food Microbiology**. New Delhi: Mc.Graw Hill Publishing Company, Ltd
- Fujiwara, N. and K. Yamamoto. 1987. **Production of alkaline protease in low cost medium by alkalophilic *Bacillus sp.* and properties of the enzyme**. J. Ferment. Technol. 65(3):345-348
- 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

- Hidayat, N., M.C. Padaga dan S. Suhartini. 2006. **Mikrobiologi Industri**. Andi. Yogyakarta
- Hoffman M dan Decho WA. 2000. **Proteolytic enzyme in the marine bacterium *Pseudoaeromonas atlantica*: post-secretional activation an effects of environmental conditions**. Aquatic Mic Ecol 23: 29-39
- Kamelia, R., M. Sindumarta dan D. Natalia. 2005. **Isolasi dan Karakteristik Protease Intraseluler Termotabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus***. Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung. Bandung
- Khopkar. 2002. **Konsep Dasar Kimia Analitik**. UI Press. Jakarta
- Kosim. M dan Surya R. P. 2009. **Pengaruh Suhu Pada Protease Dari *Bacillus Subtilis***. Jurusan Kimia FMIPA ITS. Surabaya
- Lay, B.W., 1994. **Analisis Mikrobiologi di Laboratorium**. Raja Grafindo Persada, Jakarta
- La Anas. 2008. **Ikan Teri**. <http://teri.laanassite.id/>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 14.00 WIB
- Muchtadi, D., Palupi, N. S., dan M. Astawan. 1992. **Enzim dalam Industri Pangan**. Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor
- Murray R. K. et al., 2003. **Biokimia Harper**. Alih bahasa: Andry Hartono. Ed.25, Jakarta: EGC. Hal 96
- Ogrydziak, D.M. 1993. **Yeast extracellular proteases**. Cri.Rev. Biotech.:1-55
- Putranto, Wendry Setiyadi. 2006. **Purifikasi dan Karakterisasi Protease yang Dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam Fermentasi Susu Sapi Perah**. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Bandung
- Richana, N., Irawadi, T.T., Nur, A dan Syamsu, K. 2008. **Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase serta Karakterisasi Enzimnya**. Jurnal AgroBiogen 4 (1): 24-34
- Roosdiana, Kartikaningsih, Suharjono, R. Peranginangin, Murdinah. 2003. **Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus sp* Penghasil Protease dari Kulit Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sanguineus*)**. Jurnal Ilmu-ilmu Hayati Volume 15 no. 2 Desember 2003. Fakultas MIPA dan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 140
- Rustam, A. 1988. **Isolasi Enzim Peroksidase dari Lobak (*Raphanus sativus* lian) dengan Metode Keilin**. FMIPA UI, Jakarta
- Schlegel, H.G. 1994. **Mikrobiologi Umum**. Ed ke-6. Baskoro, T.R.M., penerjemah; Wattimena J.R., editor. Yogyakarta; Gajah Mada Universiti Press. Terjemahan dari: Allgemeine Mikrobiologie. Hlm: 218-227

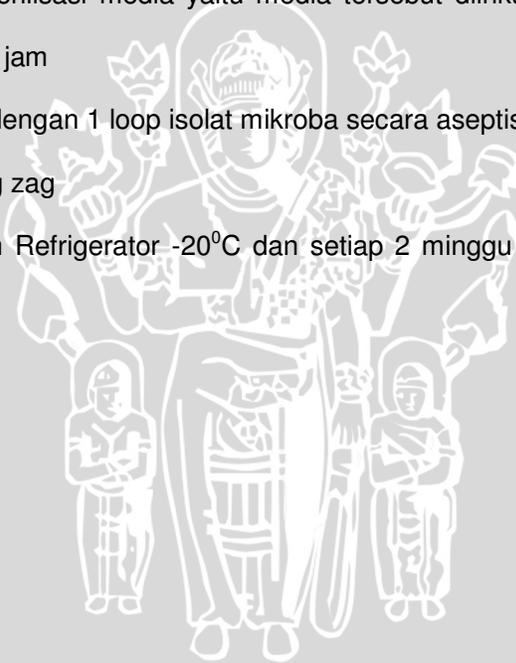
- Seeley jr.H.W. and Vandemark.P.J. 1976. **Selected Exercises From Microbes in Action a Laboratory Manual of Microbiology**. Cornell University. London.
- Starr MP, editor. 1964. **Global Impacts of Applied Microbiology**. New York: John Wiley & Sons Inc
- Sugiyono dan Tatik, K. 2002. *Aktivitas Protease Bakteri Terseleksi P.1 Pada Berbagai Media Selektif*. FMIPA – Kimia IPB. Bogor
- Suhartono MT. 1989. **Enzim dan Bioteknologi**. Departemen Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Sumardi dan D. Lengkana. 2009. **Isolasi Bacillus Penghasil Protease dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung**. Skripsi: FMIPA - Unila. Bandar Lampung
- Susanti, V.H, (2003), **Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15**, FKIP, Universitas Sebelas Maret Surakarta
- Utarti, Esti. et al., 2009. **Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus sp.*** Jurusan Biologi FMIPA. Universitas Jember. Jember
- Ward, O. P. 1983. **Proteinase**. Di dalam *Microbial Enzyme And Biotechnology*. W. M. Fogarty. Applied Science Publisher. New York
- Whitaker JR. 1994. **Principles of Enzymology for the Food Science**. Ed ke-2. New York: Marcel Dekker Inc
- Wikipedia. 2009. **Teri**. <http://Teri/Wikipedia.id>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 14.00 WIB
- Winarno, F. G. 1986. **Enzim Pangan**. Gramedia. Jakarta
- Yumei dan Yulia. 2008. **Metode Penelitian Sosial (Resume)**. <http://images.deejulz.multiplycontent.com/attachment/0/SK1kaQoKCr4AAB@yyvc1/Metode%20Penelitian%20Sosial--Resume.doc?nmid=111593288>. Diakses 30 Agustus 2009. Pukul 14.00 WIB
- Zaelanie, K dan R. Nurdiani. 2004. **Diktat Kuliah Teknologi Hasil Perikanan I (THP I)**. Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya. Malang

## LAMPIRAN

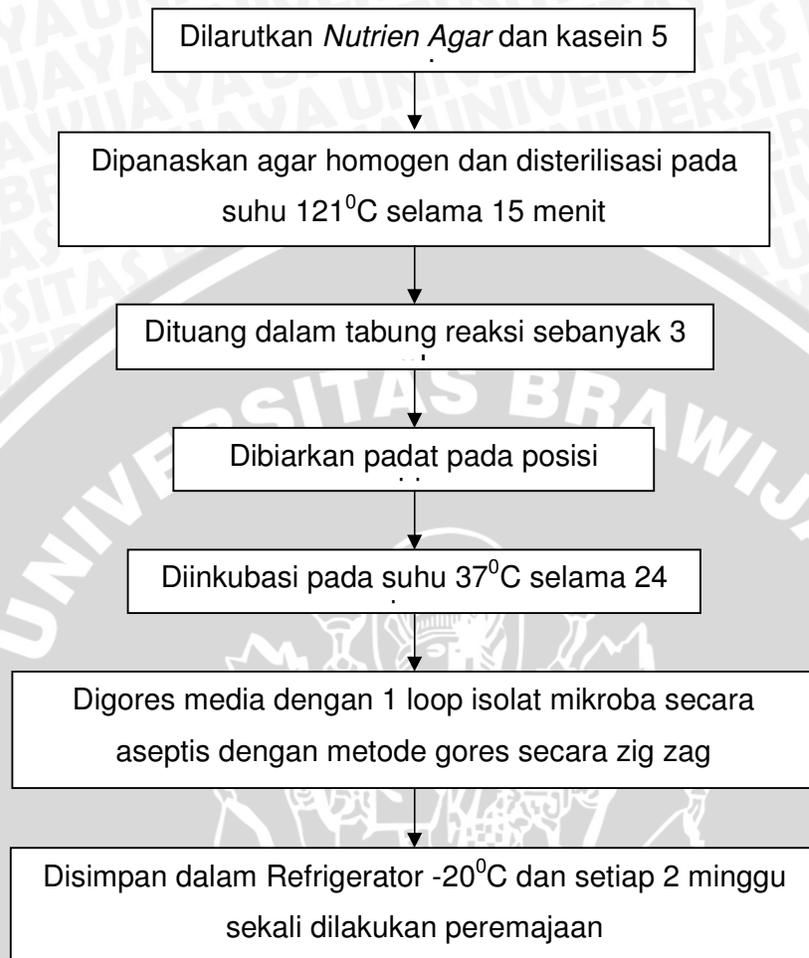
### Lampiran 1. Pembuatan Kultur Stok Isolat

#### 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

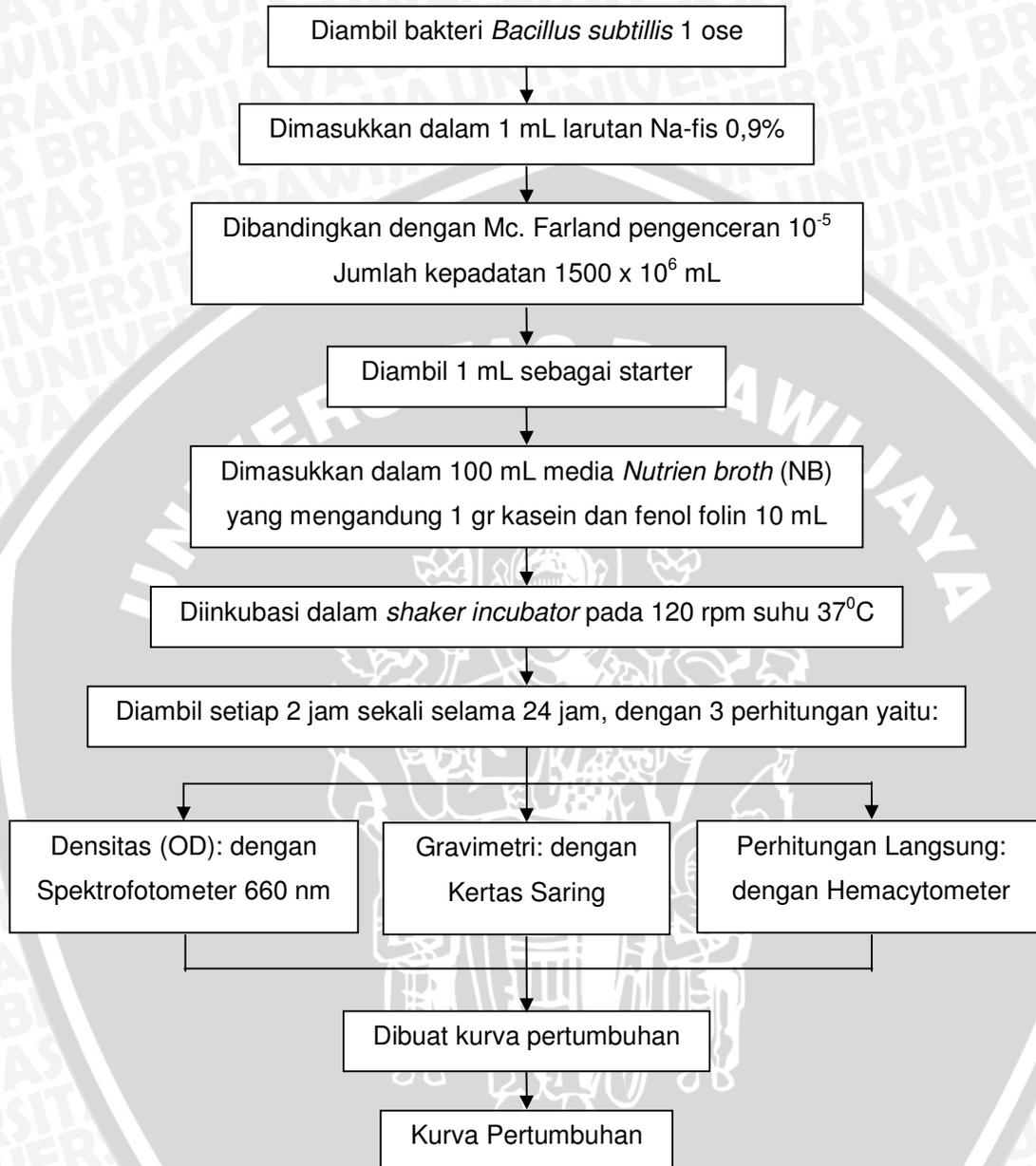


## Lampiran 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

### 2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

- Diambil bakteri *Bacillus subtilis* 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  $1500 \times 10^6$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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

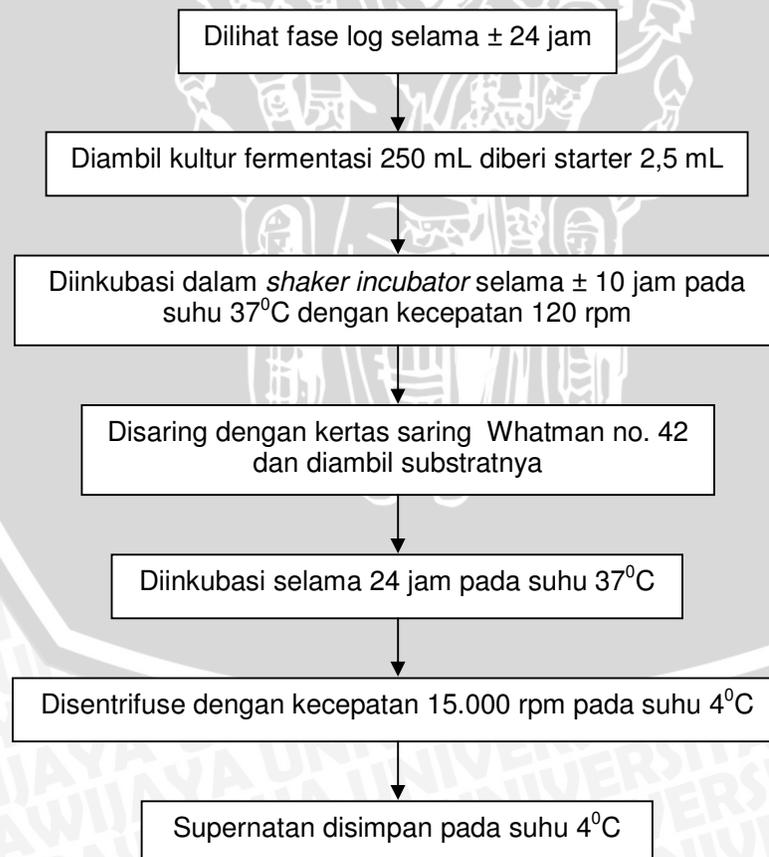


### Lampiran 3. Penentuan Produksi Enzim (*crude enzim*)

#### 3.1 Penentuan Produksi Enzim (*crude enzim*)

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

#### 3.2 Penentuan Produksi Enzim (*crude enzim*)

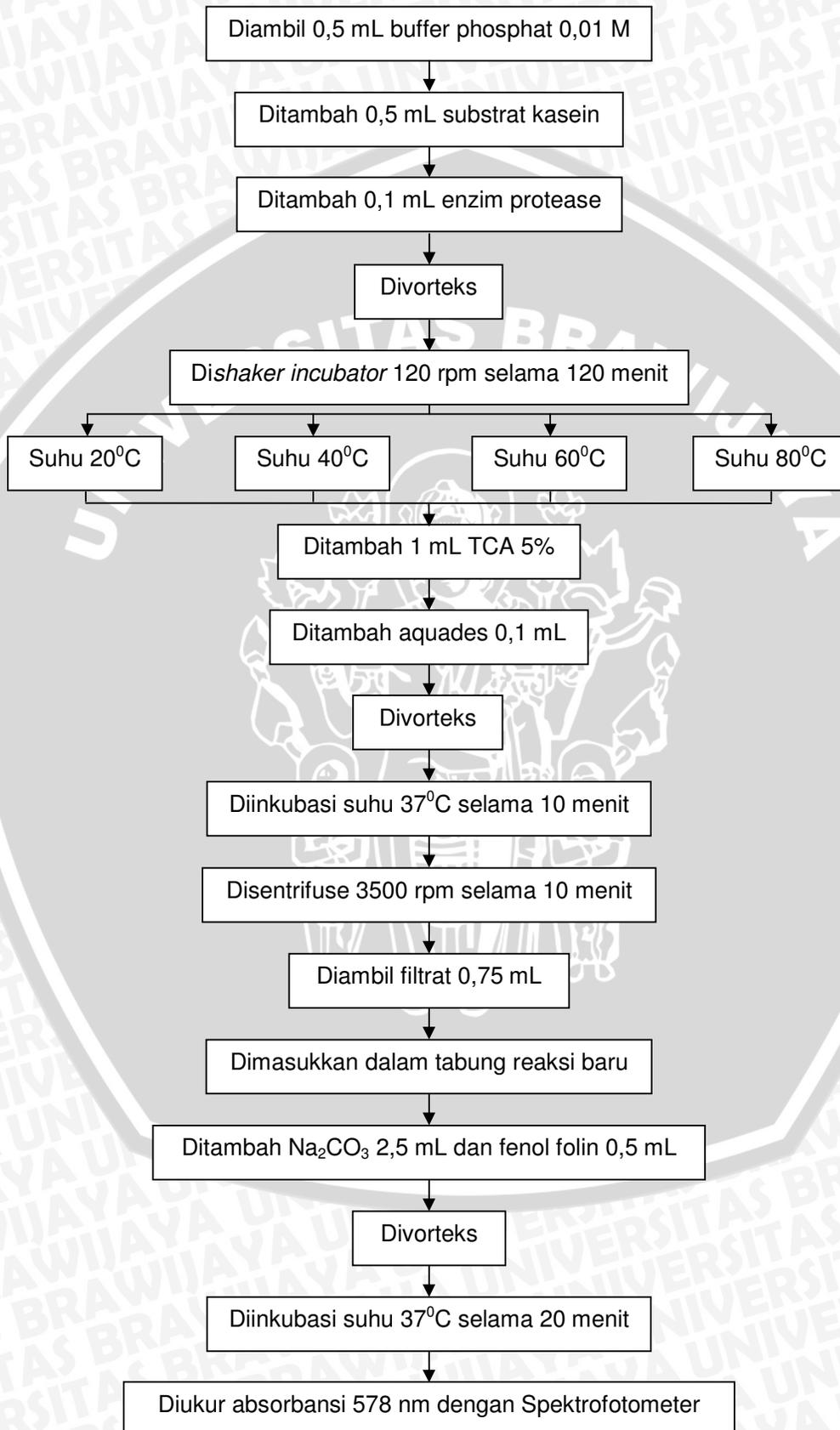


## Lampiran 4. Penentuan Suhu Optimum

### 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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

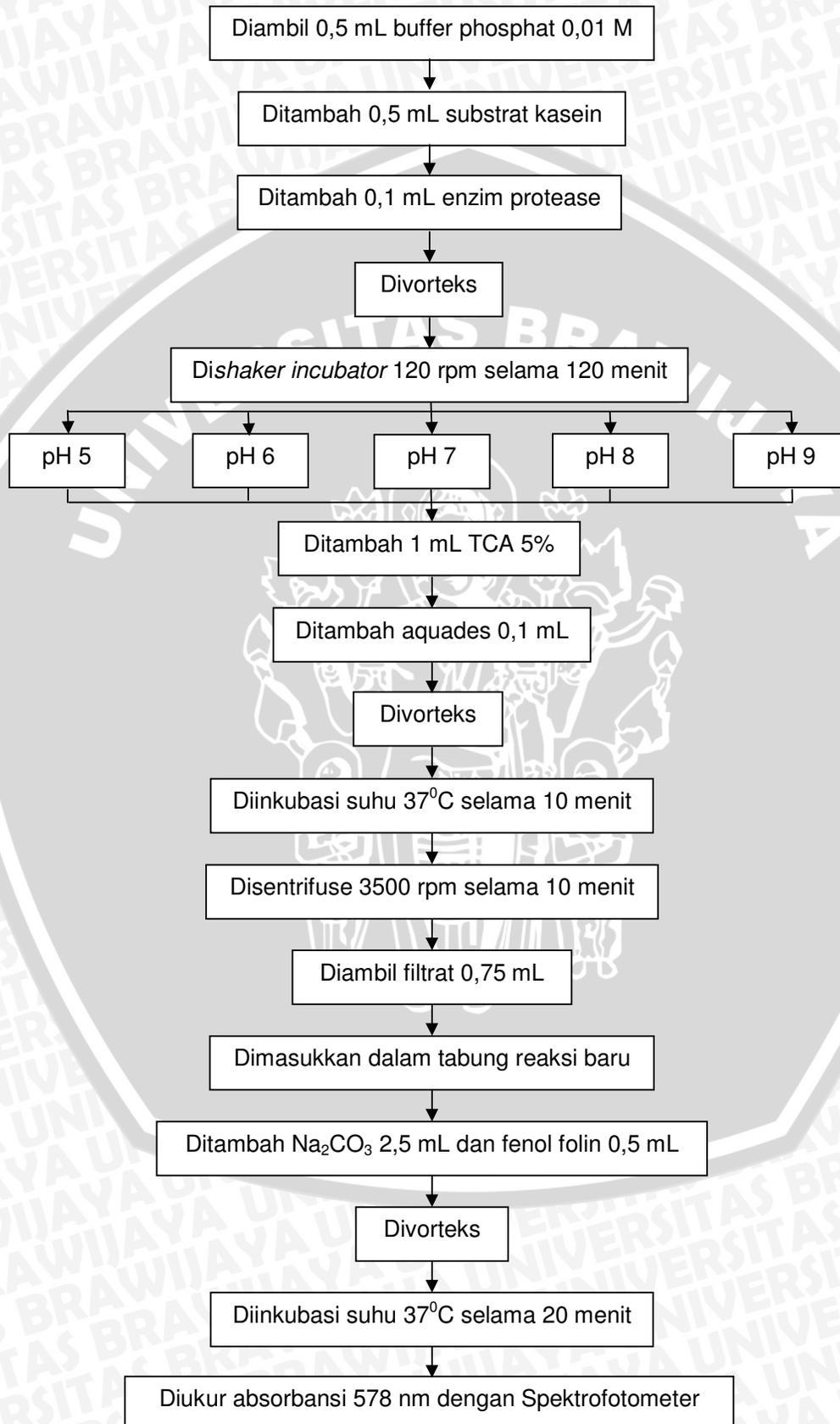


## Lampiran 5. Penentuan pH Optimum

### 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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

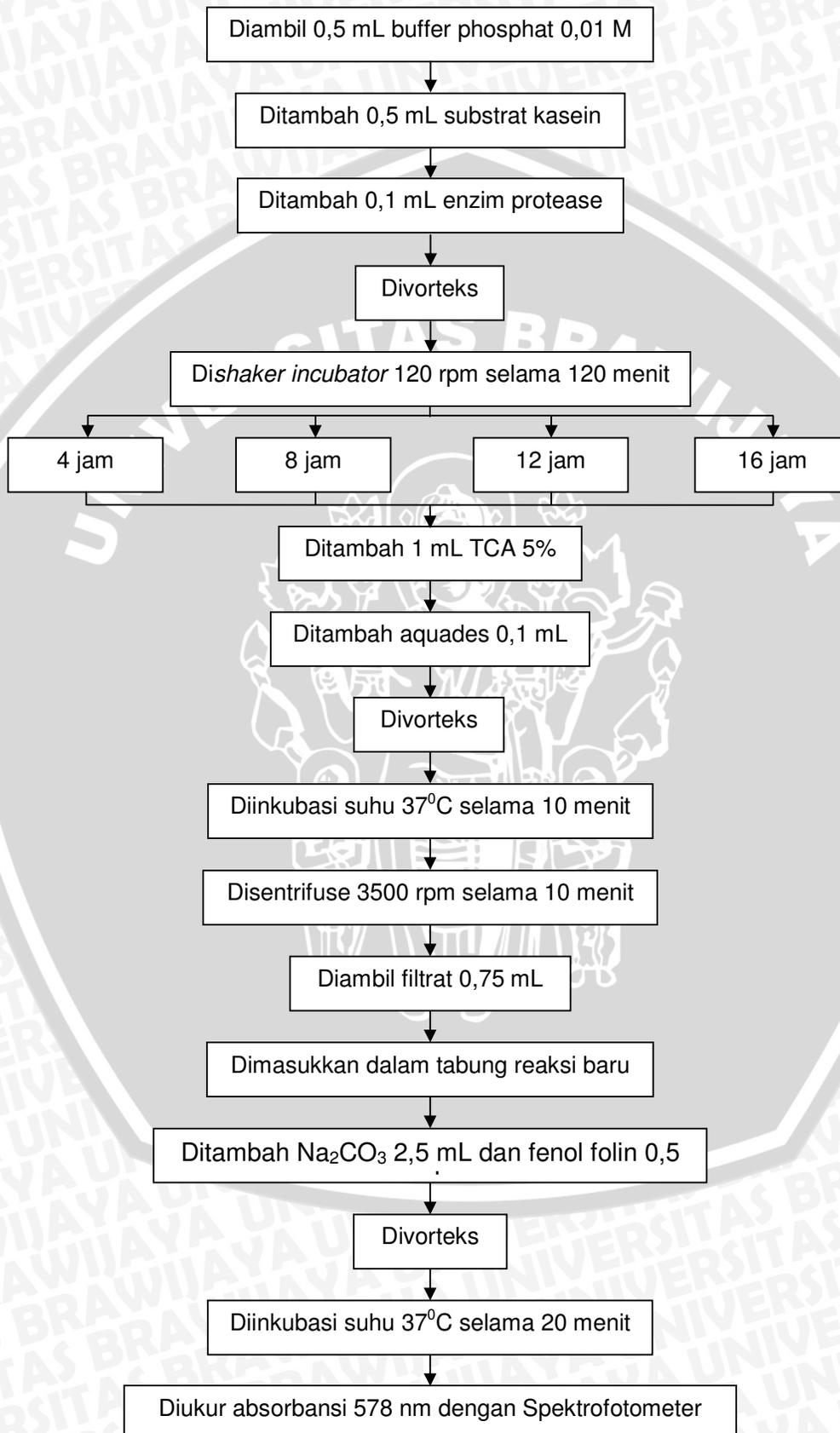


## Lampiran 6. Penentuan Waktu Inkubasi

### 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 1 mL pereaksi folin-phenol ciocalteu
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

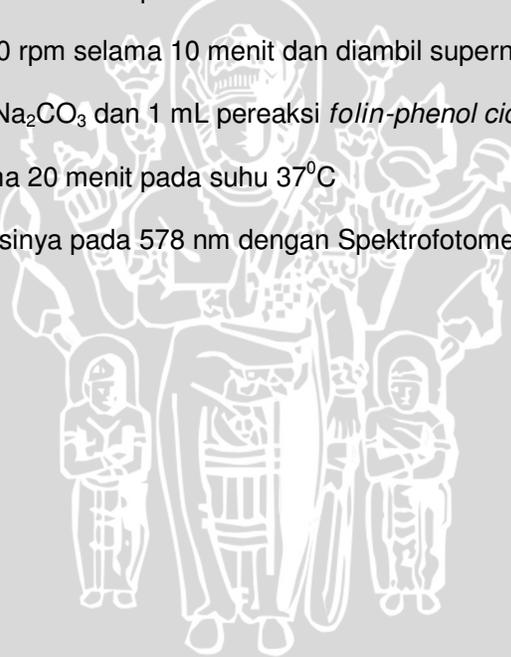
#### 7.1.2 Pembuatan Blanko

- 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

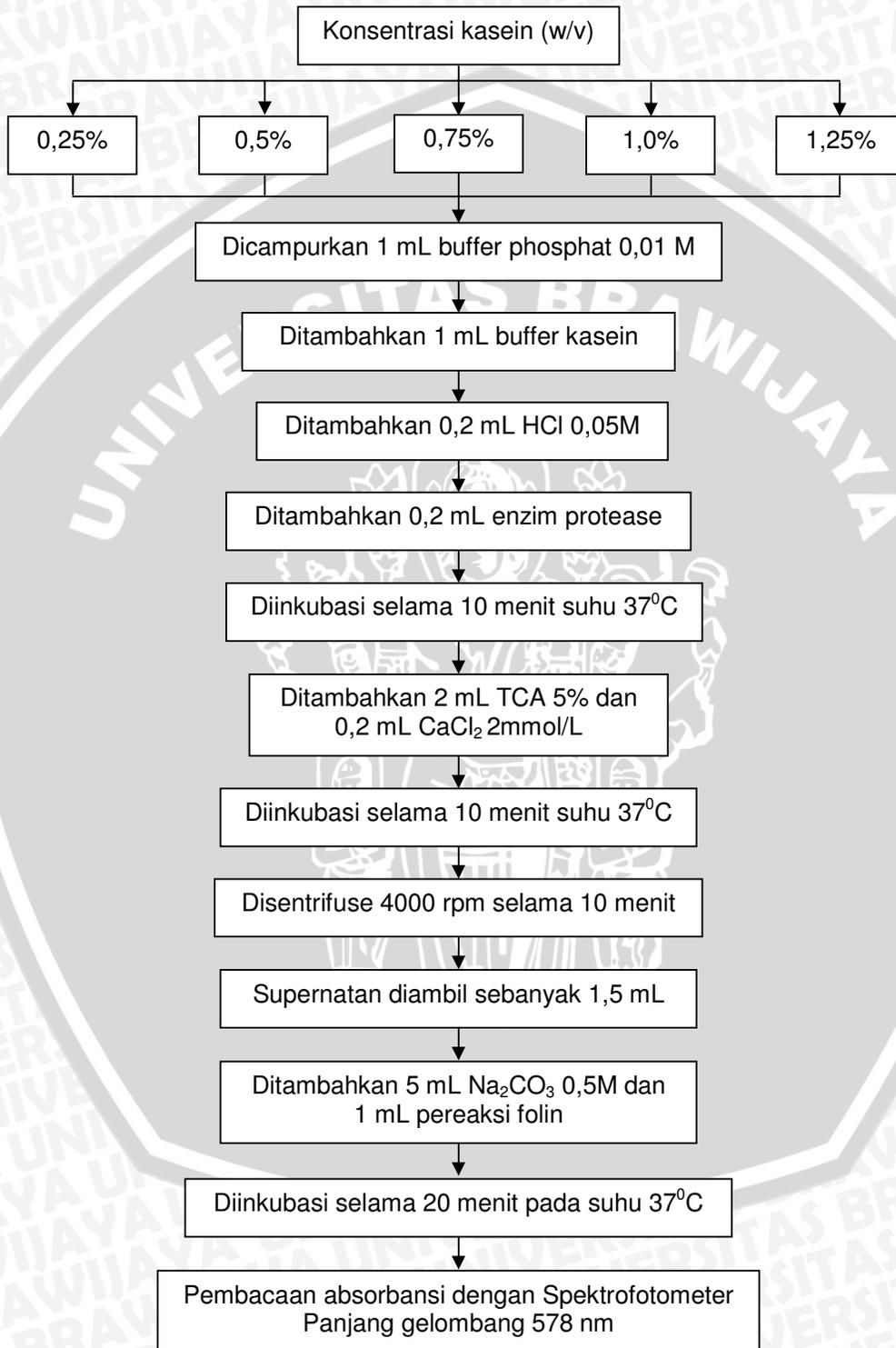
### 7.1.3 Pembuatan Standar

- 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  $37^\circ\text{C}$
- Ditambahkan 2 mL TCA 5% dan 0,2 mL larutan enzim protease
- Diinkubasi selama 10 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$
- Disentrifuse 4000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatan 1,5 mL
- Dicampur 5 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 1 mL pereaksi *folin-phenol ciocalteu*
- Diinkubasi selama 20 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$
- Diukur absorbansinya pada 578 nm dengan Spektrofotometer

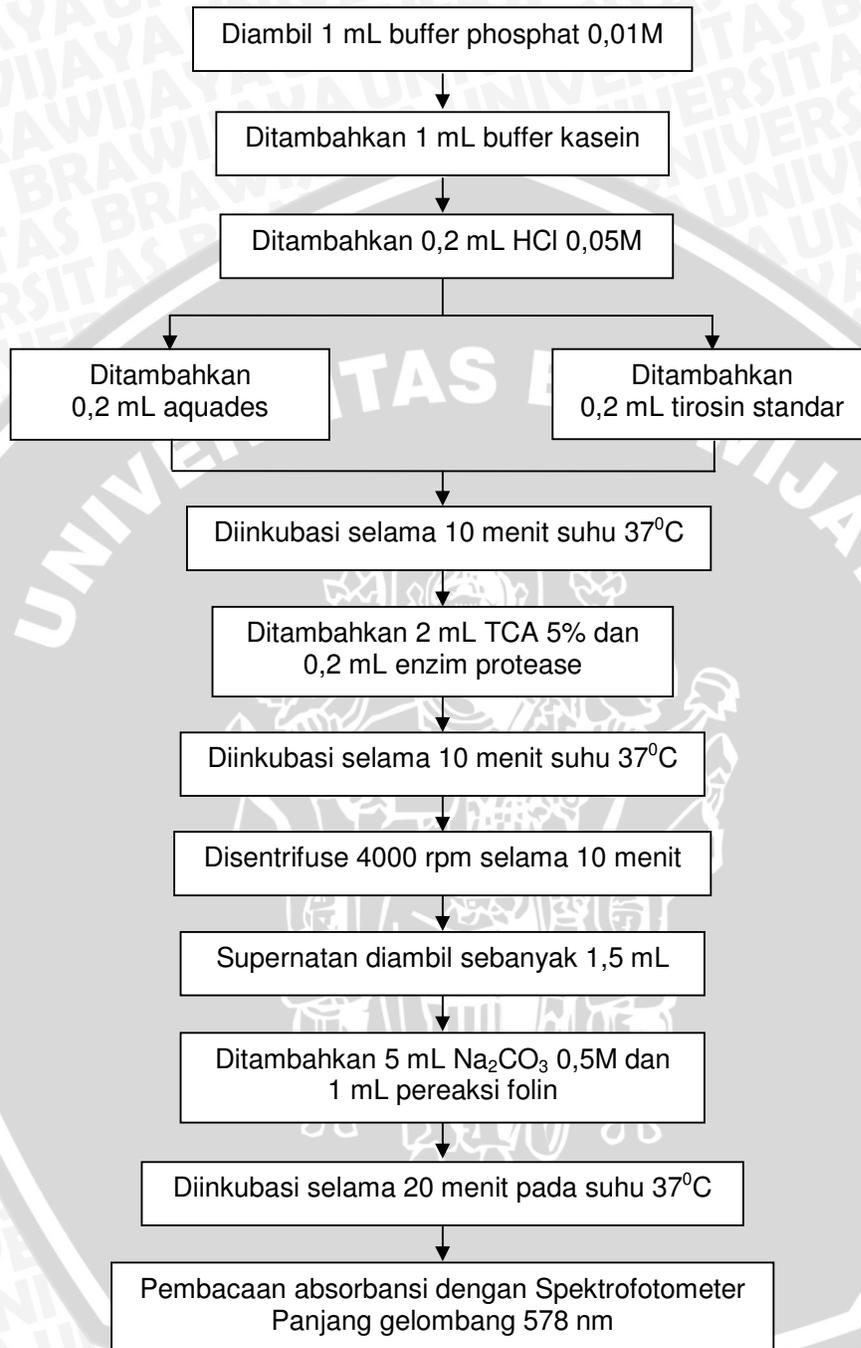


## 7.2 Skema Penentuan $V_{maks}$ dan $K_m$

### 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) 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:

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



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

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

**Setting nilai absorbansi = 0**

**Setting nilai transmitansi = 100 %**

Penentuan kalibrasi dilakukan denganikuti prosedur sebagai berikut:

- Dilakukan dengan larutan blangko (berisi pelarut murni yang digunakan dalam sampel) dengan kuvet yang sama.
- Setiap perubahan panjang gelombang diusahakan dilakukan proses kalibrasi.

- 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 I., 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 spektrofotometer enzim protease *Bacillus subtilis*

Substrat	Ulangan ke-		Rerata
	1	2	
0.25%	0.488	0.514	0.501
0.50%	0.604	0.592	0.598
0.75%	0.672	0.772	0.722
1.00%	0.800	0.892	0.846
1.25%	0.911	0.999	0.955

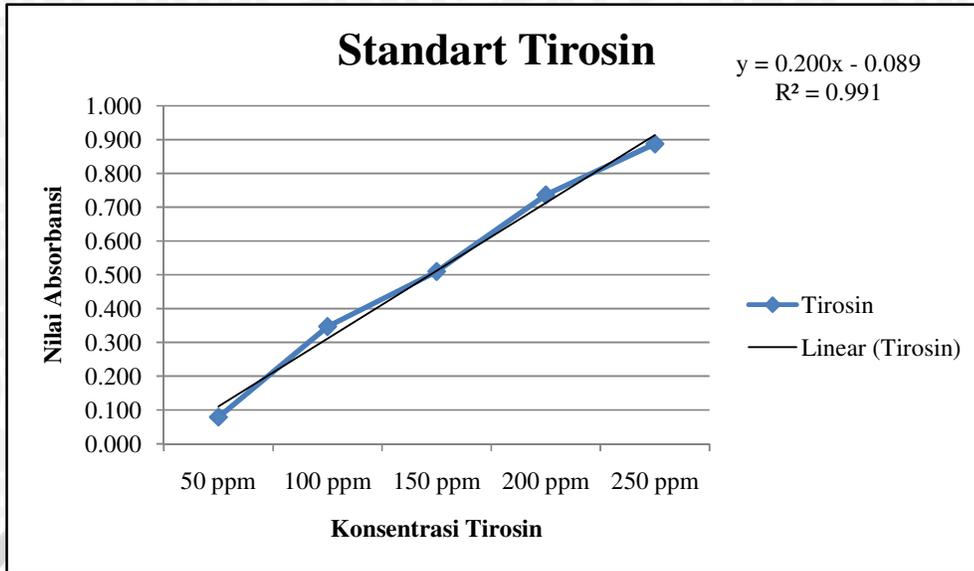
### Perhitungan Kecepatan Reaksi (V)

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

Standar tirosin yang digunakan yaitu:

Konsentrasi	Tirosin		Rerata
	1	2	
50 ppm	0.082	0.076	0.079
100 ppm	0.345	0.349	0.347
150 ppm	0.514	0.506	0.510
200 ppm	0.734	0.739	0.737
250 ppm	0.894	0.881	0.888

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	0.501	$X = (0.501 + 0.081)/0.191$	3.047120
0.50	0.598	$X = (0.598 + 0.081)/0.191$	3.554974
0.75	0.722	$X = (0.722 + 0.081)/0.191$	4.204188
1.00	0.846	$X = (0.846 + 0.081)/0.191$	4.853403
1.25	0.955	$X = (0.955 + 0.081)/0.191$	5.424084

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

Substrat dapat dihitung dengan rumus:

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

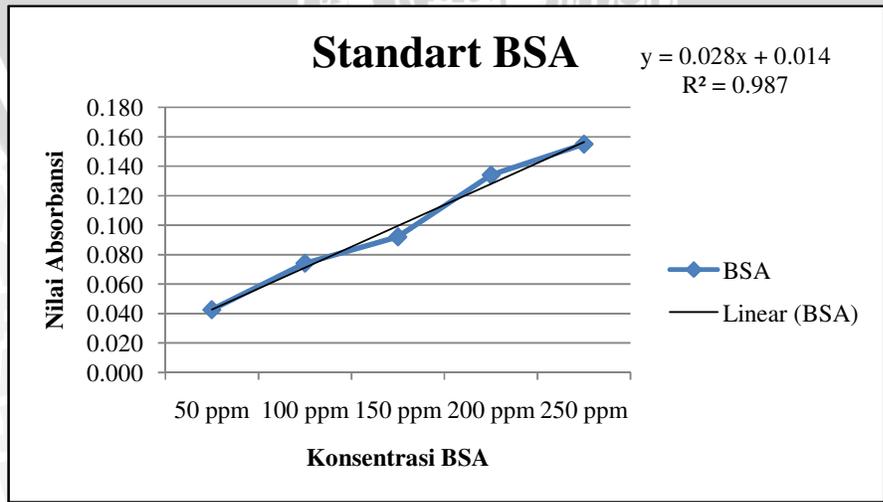
Konsentrasi (ppm)	Pengenceran 100x	V (μmol/menit/L)	1/V
3.047120	304.7120	0.000168173	5946.269759
3.554974	355.4974	0.000196201	5096.802651
4.204188	420.4188	0.000232032	4309.749689
4.853403	485.3403	0.000267863	3733.256742
5.424084	542.4084	0.000299359	3340.472008

**Perhitungan Konsentrasi Substrat (S)**

Untuk mendapatkan nilai konsentrasi substrat dihitung terlebih dahulu konsentrasi masing-masing sampel berdasarkan persamaan regresi linear kurva satandart BSA dengan reagen biuret yaitu:

Konsentrasi	BSA		Rerata
	1	2	
50 ppm	0.046	0.039	0.043
100 ppm	0.077	0.071	0.074
150 ppm	0.095	0.089	0.092
200 ppm	0.132	0.136	0.134
250 ppm	0.151	0.159	0.155

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	$X = (Y + 0,029)/0,23$	Konsentrasi (ppm)
0.25	0.501	$X = (0.501 + 0,029)/0,23$	20.52174
0.50	0.598	$X = (0.598 + 0,029)/0,23$	24.73913
0.75	0.722	$X = (0.722 + 0,029)/0,23$	30.13043
1.00	0.846	$X = (0.846 + 0,029)/0,23$	35.52174
1.25	0.955	$X = (0.955 + 0,029)/0,23$	40.26087

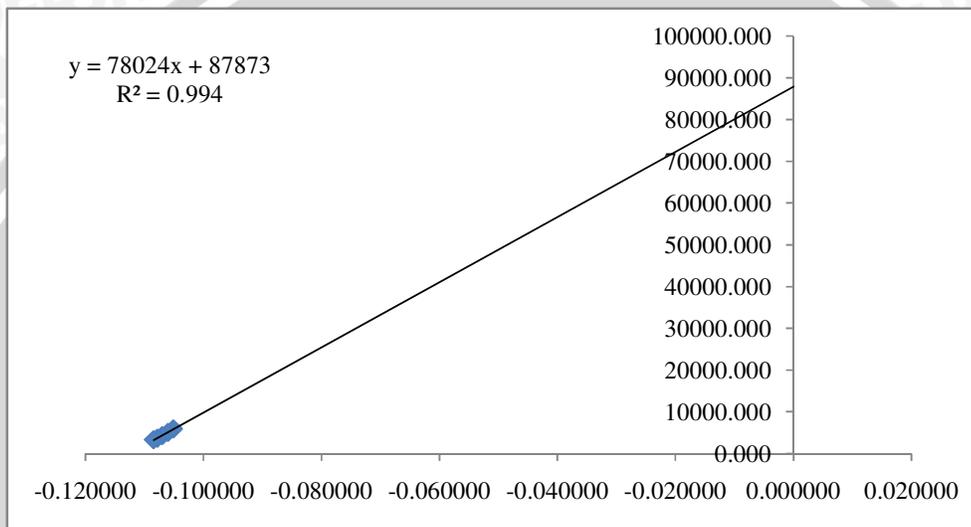
Konsentrasi substrat (s) masing-masing hidrolisi pada berbagai konsentrasi enzim : substrat dapat dihitung dengan rumus : konsentrasi substrat

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

Konsentrasi (ppm)	gr	s	Log s	1/s
20.52174	$2.05217 \times 10^{-5}$	$3.06295 \times 10^{-10}$	-9.513860640	-0.10511
24.73913	$2.47391 \times 10^{-5}$	$3.69241 \times 10^{-10}$	-9.432690372	-0.10601
30.13043	$3.01304 \times 10^{-5}$	$4.49708 \times 10^{-10}$	-9.347069404	-0.10699
35.52174	$3.55217 \times 10^{-5}$	$5.30175 \times 10^{-10}$	-9.275580582	-0.10781
40.26087	$4.02609 \times 10^{-5}$	$6.00909 \times 10^{-10}$	-9.221191652	-0.10845

### 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 Michealis-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  $y = 78024 + 87873$  dimana untuk mendapatkan nilai  $K_M$  (+), y harus dijadikan 0 (nol). Adapun perhitungannya sebagai berikut:

$$0 = 78024 + 87873$$

$$78024 = - 87873$$

$$X = - 1.1262304$$

$$-1/K_M = - 1.1262304$$

$$K_M = 0.8879178 \text{ M}$$

$$= 0.8879178 \times 10^3 \text{ mM}$$

$$= 887,9178 \text{ mM}$$

### Perhitungan $V_{\text{maks}}$

Untuk mengetahui kecepatan reaksi maksimum enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis* dapat diketahui dari persamaan kurva linier diatas  $y = 78024 + 87873x$  dimana untuk mendapatkan kecepatan reaksi maksimum ( $y$ ),  $x$  harus dijadikan 0 (nol). Sedangkan perhitungannya sebagai berikut:

$$1/V_{\text{maks}} = 87873$$

$$\begin{aligned} V_{\text{maks}} &= 0.0000114 \text{ M L}^{-1} \text{ min}^{-1} \\ &= 0.0114 \text{ mM L}^{-1} \text{ min}^{-1} \end{aligned}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 12. Perhitungan Penentuan Suhu Optimum

Suhu	Ulangan ke-		Total	Rerata	STD
	1	2			
20°C	0,648	0,648	1,296	0,648	0,000
40°C	1,204	1,278	2,481	1,241	0,052
60°C	0,630	0,500	1,130	0,565	0,092
80°C	0,352	0,389	0,741	0,370	0,026

## Perhitungan Penentuan Suhu Optimum:

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

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 20°C

- Ulangan 1:

$$U = \frac{0,097 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 0,548 \text{ U/m/mL}$$

- Ulangan 2:

$$U = \frac{0,097 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 0,548 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 0,648 \text{ U/m/mL}$$

- Suhu 40°C

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,127 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,204 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

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

$$= 1,277 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,241 \text{ U/m/mL}$$

- **Suhu 60°C**

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,096 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 0,529 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

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

$$= 0,500 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 0,565 \text{ U/m/mL}$$

- **Suhu 80°C**

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,081 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 0,352 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,083 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 0,388 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 0,370 \text{ U/m/mL}$$

## Lampiran 13. Perhitungan Penentuan pH Optimum

pH	Ulangan ke-		Total	Rerata	STD
	1	2			
5	1.759	1.833	3.593	1.796	0.052
6	2.352	2.778	5.130	2.565	0.301
7	1.833	2.556	4.389	2.194	0.511
8	1.722	1.667	3.389	1.694	0.039
9	1.463	1.389	2.852	1.426	0.052

## 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:

$$U = \frac{0,157 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,759 \text{ U/m/mL}$$

## Ulangan 2:

$$U = \frac{0,161 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,833 \text{ U/m/mL}$$

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

- 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:**

$$U = \frac{0,212 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 2,778 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 2,565 U/m/mL

- pH 7

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,161 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,833 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,200 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 2,566 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 2,194 U/m/mL

- pH 8

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,155 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,722 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,152 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,667 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 1,694 U/m/mL

## ▪ pH 9

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,141 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,463 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,137 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,389 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,436 \text{ U/m/mL}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 14. Perhitungan Penentuan Waktu Inkubasi

Waktu	Ulangan ke-		Total	Rerata	STD
	1	2			
4	4.463	4.426	8.889	4.444	0.026
8	4.852	5.352	10.204	5.102	0.354
12	5.537	5.315	10.852	5.426	0.157
16	5.204	4.907	10.111	5.056	0.210

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:

$$U = \frac{0,303 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 4,453 \text{ U/m/mL}$$

Ulangan 2:

$$U = \frac{0,301 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 4,426 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 4.444 U/m/mL

- **Waktu Inkubasi 8 jam**

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,324 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 4,582 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

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

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

Rata-rata = 5.102 U/m/mL

- **Waktu Inkubasi 12 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:**

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

$$= 5,315 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 5.426 U/m/mL

- **Waktu Inkubasi 16 jam**

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,343 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

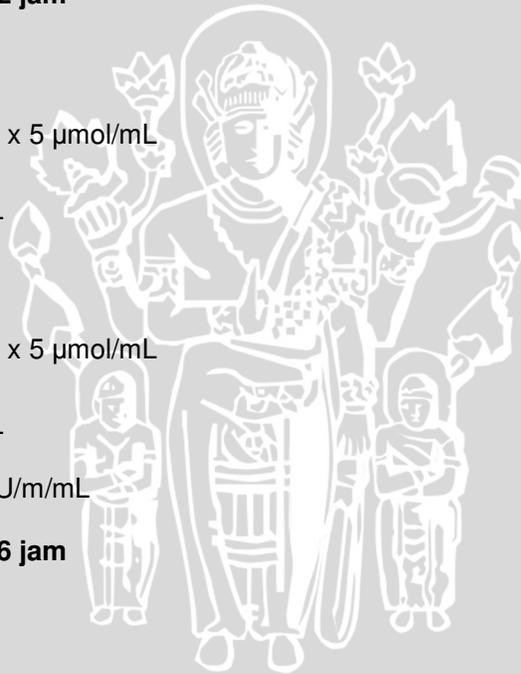
$$= 5,204 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,327 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 4,907 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 5.056 U/m/mL



♣ **Data Perhitungan Aktivitas Enzim Pada Perlakuan  $V_{maks}$  dan  $K_m$**

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

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)

▪ **Substrat 0,25%**

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,158 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,777 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,150 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,629 \text{ U/m/mL}$$

Rata-rata = 1,703 U/m/mL

▪ **Substrat 0,50%**

**Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,147 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,574 \text{ U/m/mL}$$

**Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,144 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,518 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,546 \text{ U/m/mL}$$

- **Substrat 0,75%**

- **Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,144 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,518 \text{ U/m/mL}$$

- **Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,137 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,388 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,453 \text{ U/m/mL}$$

- **Substrat 1,00%**

- **Ulangan 1:**

$$U = \frac{0,155 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,722 \text{ U/m/mL}$$

- **Ulangan 2:**

$$U = \frac{0,148 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$

$$= 1,593 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,657 \text{ U/m/mL}$$

- **Substrat 1,25%**

- **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:**

$$U = \frac{0,149 - 0,062}{0,089 - 0,062} \times \frac{1}{10} \times 5 \mu\text{mol/mL}$$
$$= 1,611 \text{ U/m/mL}$$

$$\text{Rata-rata} = 1,704 \text{ U/m/mL}$$

