

**DETEKSI AKTIVITAS PROTEOLITIK ISOLAT BAKTERI
ASAL AMPAS TAHU PADA SUBSTRAT BEKATUL**

SKRIPSI

oleh
BAITAL IZZATUL BADRIYAH
0910910001



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013

**DETEKSI AKTIVITAS PROTEOLITIK ISOLAT BAKTERI
ASAL AMPAS TAHU PADA MEDIA BEKATUL**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

oleh

**BAITAL IZZATUL BADRIYAH
0910910001**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**DETEKSI AKTIVITAS PROTEOLITIK BEBERAPA ISOLAT
BAKTERI ASAL AMPAS TAHU PADA MEDIA BEKATUL**

BAITAL IZZATUL BADRIYAH
0910910001

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 08 Juli 2013
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D.
NIP. 19671213 199103 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S-1 Biologi,
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M.Agr.Sc., Ph.D.
NIP 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Baital Izzatul Badriyah
NIM : 0910910001
Jurusan : Biologi
Penulis Tugas Akhir Berjudul : Deteksi Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri Asal Ampas Tahu pada Substrat Bekatul

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 19 Juli 2013
Yang menyatakan,

Baital Izzatul Badriyah
0910910001

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DETEKSI AKTIVITAS PROTEOLITIK ISOLAT BAKTERI ASAL AMPAS TAHU PADA SUBSTRAT BEKATUL

Baital Izzatul Badriyah, Tri Ardyati
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Ampas tahu mengandung protein sebesar 23,7 % dan mengandung bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik dapat meningkatkan efisiensi penggunaan pakan ternak. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri asal ampas tahu yang memiliki aktivitas proteolitik dan mempelajari aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik pada substrat bekatul. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan dilakukan tiga kali pengulangan. Tahapan penelitian meliputi isolasi bakteri proteolitik dari ampas tahu, pengujian aktivitas bakteri proteolitik pada media *calcium caseinate agar* (CCA), karakterisasi bakteri, uji patogenisitas, pembuatan kurva pertumbuhan dan pengujian aktivitas proteolitik bakteri pada media bekatul 2 %. Data luas zona bening pada media CCA dianalisis menggunakan analisis ragam (Anova) dan dilanjutkan dengan uji Tukey, sedangkan aktivitas protease isolat bakteri pada media bekatul 2 % dianalisis menggunakan uji *Independent Sample T Test* ($\alpha = 0,05$). Isolasi bakteri dari ampas tahu diperoleh 10 isolat. Isolat TP5K1 dan TP6K5 tidak patogen ditunjukkan dengan tidak adanya zona bening pada media *blood agar*, serta menunjukkan aktivitas protease tidak berbeda selama masa inkubasi pada media bekatul 2 % ($p > 0,05$). Aktivitas protease tertinggi isolat TP5K1 yaitu sebesar 2,24 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri $5,13 \times 10^7$ sel/mL, sedangkan aktivitas protease tertinggi isolat TP6K5 sebesar 2,37 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri $5,26 \times 10^7$ sel/mL.

Kata kunci: aktivitas protease, ampas tahu, bakteri, bekatul

Detection of Proteolytic Activity Bacteria Isolated from Tofu Waste in Rice Bran Substrate

Baital Izzatul Badriyah, Tri Ardyati
Biology Department, Faculty of Science
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

Tofu waste contains 23.7 % of protein and possible containing proteolytic bacteria. Proteolytic activity of bacteria could increase the efficiency of feed utilization and helps increase the absorption of amino acids by the livestock body. This research was carried out in order to get isolates bacteria in tofu waste having proteolytic activity and to study proteolytic activity of bacteria from tofu waste in rice bran substrate. Methods used in this research were, isolation of proteolytic bacteria from tofu waste, assay of bacterial protease activity on the calcium caseinate agar (CCA) medium, characterization of pathogenicity, preparation of bacterial growth curve and protease activity assay was performed in 2 % of rice bran medium. The wide of clear zone data of isolates bacteria were analyzed using Analysis of Variance (Anova) and continued by Tukey's Test ($\alpha = 0.05$), whereas protease activity of isolates bacteria on 2 % rice bran medium were analyzed using *Independent Sample T-Test* ($\alpha = 0.05$). Isolation of bacteria from tofu waste resulted 10 isolates. Isolates TP5K1 and TP6K5 were not pathogen that shown by the absence of clear zone on blood agar medium. Protease activity isolates TP5K1 and TP6K5 were did not differ during the incubation period in the 2 % rice bran medium ($p > 0.05$). The highest protease activity of isolate TP5K1 was 2.24 Unit/mL with the cell number of bacteria is 5.13×10^7 cell/mL, whereas the highest protease activity of isolate TP6K5 was 2.37 Unit/mL with the cell number was 5.26×10^7 cell/mL.

Key words: bacteria, protease activity, rice bran, tofu waste

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbilalamin.

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat, rahmat, serta hidayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul **Deteksi Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri Asal Ampas Tahu pada Substrat Bekatul** ini dapat diselesaikan dengan baik. Penulisan Skripsi ini bertujuan untuk memenuhi syarat dalam mendapatkan gelar Sarjana Sains.

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada:

1. Ayah, Ibu, Adik, serta keluarga besar yang senantiasa memberikan doa dan dukungan selama masa pendidikan S-1 di Jurusan Biologi;
2. Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D. selaku pembimbing, serta Dr. Suharjono, M.Si dan Dr. Ir. Osfar Sjojfan, M.Sc. selaku penguji yang telah banyak memberikan dukungan dan bimbingan selama penelitian dan penulisan Skripsi;
3. Teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi (Ekwan N. Wiratno, Sri Sugiarti, Lidwina Faraline T., Sela Ayu R., Adisuryo N., Erma Kusuma. P. dan A. Ridlo), serta Wulan Sari E. P. dan Moch Hardi Baramada W. yang telah memberikan banyak masukan, dukungan dan semangat dalam penyelesaian penelitian ini;
4. Teman-teman angkatan 2009 yang telah memberikan semangat selama penyelesaian Skripsi, dan
5. Keluarga besar Jurusan Biologi yang telah banyak berperan dalam pembelajaran selama studi S-1.

Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan, oleh karena itu diharapkan saran dan kritik mengenai perbaikan Skripsi ini sebagai penyempurnaan di masa mendatang. Semoga Skripsi ini dapat dipergunakan dengan sebaik-baiknya.

Malang, 19 Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Protease dan Peran Pentingnya dalam Berbagai Bidang Industri	4
2.2 Bakteri-Bakteri Penghasil Protease	7
2.3 Ampas Tahu dan Bekatul sebagai Sumber Protein Bagi Pertumbuhan Bakteri Proteolitik	8
2.4 Pengujian Aktivitas Protease	10
BAB III METODE PENELITIAN	13
3.1 Waktu dan Tempat	13
3.2 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Proteolitik dari Ampas Tahu	13
3.3 Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik	13
3.4 Uji Kualitatif Aktivitas Protease dari Isolat Bakteri Proteolitik	15
3.5 Uji Patogenisitas	15
3.6 Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Proteolitik pada Media Bekatul	15

3.7	Deteksi Aktivitas Protease Isolat Bakteri TP5K1 dan TP5K6 pada Substrat Bekatul	16
3.8	Rancangan Percobaan dan Analisis Data	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		18
4.1	Karakteristik Isolat Bakteri Proteolitik Hasil Isolasi dari Ampas Tahu	18
4.2	Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat Bakteri Proteolitik Terpilih pada Media Bekatul 2 %	23
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		28
5.1	Kesimpulan	28
5.2	Saran	28
DAFTAR PUSTAKA		29
LAMPIRAN		35



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Kadungan zat makanan ampas tahu	9
2.	Komposisi kimia bekatul	10
3.	Karakteristik isolat bakteri proteolitik terpilih	20

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Hidrolisis protein oleh protease	5
2.	Luas zona bening isolat bakteri proteolitik pada media CCA	18
3.	Zona bening isolat bakteri proteolitik pada media CCA	19
4.	Hasil pewarnaan Gram isolat bakteri proteolitik ampas tahu	21
5.	Hasil uji patogenisitas isolat bakteri proteolitik pada media <i>blood agar</i>	22
6.	Aktivitas protease isolat TP5K1 dan TP6K5 pada media bekatul 2 %	24
7.	Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease dari isolat bakteri proteolitik pada media bekatul 2 % ...	25



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Komposisi media CCA	35
2.	Komposisi media CCB	35
3.	Komposisi media cair bekatul	35
4.	Komposisi <i>reagen</i> uji aktivitas enzim protease	35
5.	Pembuatan kurva baku tirosin	35
LT1.	Karakter morfologi koloni bakteri proteolitik asal ampas tahu	36
LT2.	Hasil analisis proksimat bekatul	37
LT3.	Perbandingan luas zona bening isolat bakteri proteolitik ampas tahu	37
LT4.	Perbandingan aktivitas protease isolat TP5K1 dan TP6K5	37
LT5.	Uji normalitas luas zona bening isolat bakteri proteolitik ampas tahu	38
LT6.	Uji homogenitas data luas zona bening Isolat bakteri proteolitik terpilih	38
LT7.	Perbedaan luas zona bening isolat bakteri proteolitik terpilih	39
LT8.	Uji normalitas aktivitas enzim dan jumlah sel isolat bakteri proteolitik terpilih	39
LT9.	Uji homogenitas aktivitas protease isolat bakteri proteolitik terpilih	40
LG1.	Kurva baku tirosin	40
LG2.	Kerangka operasional	41

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Lambang/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
TP5K1	isolat bakteri proteolitik ampas tahu, tumbuh pada pengenceran 10^{-5} , koloni pertama
TP6K4	isolat bakteri proteolitik ampas tahu, tumbuh pada pengenceran 10^{-6} , koloni keempat
TP6K5	isolat bakteri proteolitik ampas tahu, tumbuh pada pengenceran 10^{-6} , koloni kelima
TP6K8	isolat bakteri proteolitik ampas tahu, tumbuh pada pengenceran 10^{-6} , koloni kedelapan
TP6K9	isolat bakteri proteolitik ampas tahu, tumbuh pada pengenceran 10^{-6} , koloni kesembilan
CCA	<i>calcium caseinate agar</i>
CCB	<i>calcium caseinate broth</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
TPC	<i>total plate count</i>
OD	<i>optical density</i>
nm	nano meter
U	Unit
Log	Logaritma
mL	mili Liter
%	persen
°	derajat
β	Beta
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> spesies
dkk.	dan kawan-kawan
<i>pericarp</i>	jaringan yang mengelilingi biji
<i>seed coat</i>	testa
<i>nucellus</i>	badan bakal biji
<i>aleurone</i>	lapisan protein pada bulir padi
TCA	<i>trichloro acetic acid</i>
pH	satuan tingkat keasaman
NaCO ₃	sodium karbonat
M	Molar
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>

UV

w/v

NaCl

pour plate

spread plate

agar slant

refrigerator

shaker

Tris HCl

U/g

ultraviolet

berat per volume

sodium klorida

metode cawan tuang

metode cawan sebar

media agar miring

almari pendingin

inkubator goyang

tris (hydroxymethyl) aminomethane

hydrochloride

Unit per gram



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagai salah satu negara yang memiliki biodiversitas sangat besar, Indonesia menyediakan banyak sumberdaya alam hayati yang tak ternilai harganya termasuk berbagai mikroorganisme. Eksplorasi mikroorganisme yang potensial untuk diaplikasikan dalam berbagai bidang, misalnya bidang industri perlu dilakukan secara terus menerus (Sutandi, 2003). Salah satu produk industri yang penting dan bernilai tinggi yang dihasilkan oleh mikroorganisme adalah enzim. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim (Akhdia, 2003).

Menurut Jenni (2003) enzim adalah katalis organik yang dihasilkan oleh makhluk hidup. Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi dan sangat spesifik untuk reaksi yang dikatalisnya, artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu jenis reaksi kimia. Enzim memegang peranan penting dalam dunia industri, salah satu diantaranya yaitu protease (Muctadi dkk., 1992). Protease merupakan salah satu enzim penting yang digunakan secara luas pada industri melalui reaksi sintesis atau reaksi hidrolisis dan telah hampir mencapai 65 % dari total penjualan enzim di dunia (Huang dkk., 2006). Protease digunakan pada beberapa industri, seperti pengempukan daging, hidrolisat protein, produk-produk makanan dan proses pengolahan limbah industri. Selain itu menurut Kurniawati (2008) protease juga berperan dalam degradasi protein menjadi asam amino, sehingga menjadikan pakan ternak lebih mudah diserap oleh pencernaan hewan ternak.

Menurut Poernomo & Djoko (2003) pemilihan mikroorganisme sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan enzim yang diisolasi dari tanaman ataupun hewan. Hal ini disebabkan sel mikroorganisme relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki produksi yang lebih banyak, biaya produksi relatif murah, kondisi selama produksi tidak bergantung pada adanya pergantian musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek.

Bakteri terdapat bebas di alam. Salah satu sumber bahan yang berpotensi terdapat bakteri proteolitik yaitu ampas tahu. Hal ini

disebabkan ampas tahu masih mengandung protein yang relatif tinggi. Ampas tahu mengandung protein sebesar 23,7 %. Selama ini ampas tahu kurang dimanfaatkan secara maksimal, diantaranya hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak, pupuk, serta sebagai bahan dasar untuk pembuatan tempe gembus dan oncom (Siregar, 1995).

Gunroro dkk. (2000) menyatakan bahwa penggunaan enzim pada pakan ternak umumnya ditujukan untuk mengurangi faktor-faktor antinutrisi dalam bahan pakan ternak, meningkatkan daya cerna bahan pakan, meningkatkan ketersediaan zat-zat gizi tertentu, serta mengurangi masalah polusi kotoran ternak. Hal ini sesuai dengan pendapat Khattak dkk. (2013) tubuh hewan ternak secara alami telah menghasilkan enzim untuk mencerna nutrisi pada pakan, namun enzim tersebut tidak sepenuhnya mampu memecah nutrisi. Hewan ternak membutuhkan enzim eksogen seperti protease yang ditambahkan pada pakan untuk membantu proses pencernaannya.

Perlu dilakukan analisis protease asal bakteri secara komersial karena dapat diaplikasikan pada industri pakan ternak, misalnya sebagai campuran bekatul yang merupakan salah satu pakan ternak. Menurut Nursalim & Razali (2007) bekatul adalah lapisan luar dari beras yang terlepas saat proses penggilingan gabah. Damayanthi dkk. (2007) menyatakan bahwa bekatul banyak mengandung nutrisi diantaranya kandungan protein yang mencapai 11,5-17,2 %. Jika isolat bakteri proteolitik non patogen yang diisolasi dari ampas tahu ditambahkan pada bekatul diharapkan akan mampu membantu pemecahan protein bekatul menjadi molekul yang lebih sederhana. Hal ini akan menyebabkan penyerapan asam amino oleh tubuh hewan ternak akan menjadi semakin mudah.

Melihat potensi aplikasi yang menjanjikan dari protease bakteri pada bidang industri, khususnya industri pakan ternak, maka penelitian ini penting untuk dilakukan. Hal ini dilakukan agar diperoleh isolat bakteri yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan protease dan dapat diaplikasikan pada pakan ternak (bekatul).

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang diangkat pada penelitian ini yaitu:

1. Isolat bakteri manakah asal ampas tahu yang memiliki aktivitas proteolitik?

2. Bagaimana aktivitas proteolitik yang dihasilkan oleh bakteri asal ampas tahu pada substrat bekatul?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mendapatkan isolat bakteri asal ampas tahu yang memiliki aktivitas proteolitik.
2. Mengetahui aktivitas proteolitik yang dihasilkan oleh bakteri asal ampas tahu pada substrat bekatul.

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini yaitu:

1. Isolat bakteri proteolitik dari ampas tahu dapat diaplikasikan pada pakan ternak, sehingga pakan memiliki tingkat pencernaan yang tinggi dan akan meningkatkan berat badan hewan ternak.
2. Isolat bakteri proteolitik yang diperoleh dari penelitian ini juga dapat digunakan untuk meningkatkan produktivitas hewan ternak, seperti peningkatan kualitas daging dan telur.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

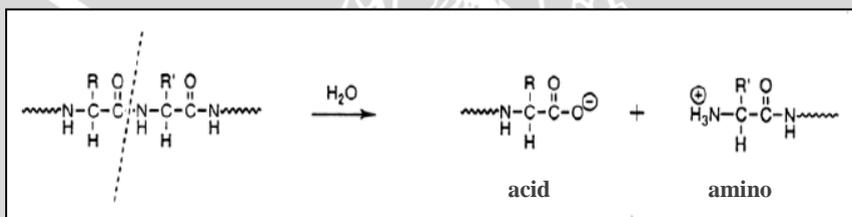
2.1 Protease dan Peran Pentingnya dalam Berbagai Bidang Industri

Menurut Akhirany (2011) enzim merupakan senyawa protein yang berfungsi sebagai katalisator untuk mempercepat reaksi pemecahan senyawa-senyawa yang kompleks menjadi sederhana. Saat ini telah teridentifikasi lebih kurang 3.000 enzim. Walaupun dalam tubuh makhluk hidup enzim dapat diproduksi sendiri sesuai dengan kebutuhan, penambahan enzim pada ransum kadangkala masih dibutuhkan. Hal ini disebabkan beberapa faktor seperti antinutrisi pada bahan pakan (inhibitor lektin dan tripsin), rendahnya efisiensi pencernaan bahan pakan, dan ketidakterersediaan enzim tertentu dalam tubuh ternak. *Xylanase* dan β -*glucanase* merupakan contoh enzim yang digunakan pada pakan ternak untuk meningkatkan daya cerna. Rendahnya kemampuan ternak muda untuk mencerna protein pada kacang kedelai (*glycin* dan β -*conglycin*) dapat diatasi dengan penambahan enzim protease.

Protease merupakan kelompok enzim-enzim yang sangat kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersial. Protease ekstraselular sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik intraselular memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel hewan, tumbuhan dan mikroorganisme seperti mengganti protein, memelihara keseimbangan antara degradasi dan sintesis protein. Protease intraselular berperan dalam fungsi fisiologis lainnya, seperti pencernaan, maturasi hormon, perakitan virus, respon imun, inflamantasi, fertilisasi, koagulasi darah, fibrinolisis, kontrol tekanan darah, sporulasi, germinasi dan patogenesis (Rao dkk., 1998). Protease juga diimplikasikan dalam peran regulasi ekspresi gen serta perbaikan dan sintesis DNA (Kalisz, 1988). Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola & Widyastuti, 2002).

Protein terdiri atas molekul asam amino yang bervariasi jumlahnya, berkisar antara 10 sampai ribuan yang berfungsi sebagai

penyusun polimer protein yang terangkai melalui ikatan peptida. Protein yang memiliki lebih dari 10 asam amino disebut polipeptida, sedangkan istilah protein ditujukan bagi polimer asam amino dengan jumlah di atas 100 (Suhartono, 2000). Persatuan internasional biokimia dan biologi molekular (*The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) tahun 1984 merekomendasikan kata peptidase (E.C. 3.4) untuk enzim yang menghidrolisis rantai peptida. Protease sinonim dengan peptidase. Protease secara umum dibagi atas eksopeptidase (E.C. 3.4.21-99-) atau endopeptidase (E.C. 3.4.19-) bergantung pada lokasi tempat aksi enzim terjadi. Jika enzim memecah ikatan peptida di arah amino atau ujung karboksil dari substrat, maka diklasifikasikan sebagai eksopeptidase. Jika enzim memecah ikatan peptida jauh dari ujung amino atau karboksil diklasifikasikan sebagai endopeptidase (Whitaker, 1994).



(Walsh, 2012)

Gambar 1. Hidrolisis protein oleh protease

Protease merupakan satu diantara tiga kelompok enzim komersial yang diperdagangkan dengan nilai mencapai 60 % total penjualan enzim yang aplikasinya sebagai katalisator hayati, digunakan di dalam industri pangan, detergen dan kulit (Suhartono, 2000). Protease memegang peran utama di dalam banyak fungsi hayati, mulai dari tingkat sel, organ sampai organisme, yaitu dalam melangsungkan reaksi metabolisme, fungsi regulasi dan reaksi-reaksi yang menghasilkan sistem berantai (*cascade*) untuk menjaga homeostatis maupun kondisi patofisiologis abnormal serta proses kematian sel terencana (*apoptosis*) (Rao dkk., 1998).

Protease yang sering digunakan dalam bidang industri umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme penghasil protease dapat berupa bakteri, kapang maupun khamir. Protease bakteri mulai diperkenalkan sekitar tahun 1960 oleh Gebruder Schyder dari Swiss dan

Novo Industri A/S dari Denmark. Hingga saat ini penggunaan bakteri sebagai penghasil protease memiliki peluang besar untuk memproduksi protease dalam skala industri (Basuki, 1997).

Usaha peningkatan kualitas ternak terus dilakukan di beberapa negara maju. Banyak penelitian memperlihatkan bahwa suplemen mikroorganisme seperti protease dalam pakan ternak hewan unggas dapat berpotensi meningkatkan nilai nutrisinya (Budiansyah, 2004). Semua enzim adalah protein yang dapat diperoleh dari sumber daya hayati tanaman, hewan dan mikroorganisme. Mikroorganisme mulai dari makhluk uniselular sangat potensial sebagai penghasil enzim yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme mempunyai beberapa keunggulan bila dibandingkan dengan protease dari sumber lainnya, yaitu: dapat diproduksi dalam jumlah besar produktivitasnya mudah ditingkatkan, mutu lebih seragam, harga lebih murah, dapat ditumbuhkan dengan cepat, pertumbuhannya lebih mudah diatur dan isolasinya mudah dilakukan. Aplikasi pemanfaatan enzim dalam berbagai bidang industri antara lain karena enzim mempunyai keuntungan-keuntungan sebagai berikut: enzim merupakan bahan alami yang tidak beracun, dapat mempercepat reaksi tanpa menyebabkan terbentuknya hasil reaksi yang tidak diinginkan, kecepatan reaksi dapat diatur dengan mengatur pH, suhu dan jumlah enzim yang digunakan, aktif pada konsentrasi rendah, dapat dinaktifkan sesuai yang dikehendaki dan merupakan senyawa alamiah yang bersifat *biodegradable*, serta ramah lingkungan (Hartono, 1995).

Protease merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis molekul protein. Enzim ini berperan penting dalam metabolisme sel. Protease dimanfaatkan dalam industri pangan untuk pengolahan susu, roti, biskuit, proses pematangan keju, pengempukan daging, *debittering* dan pembuatan produk dari kedelai maupun protein hidrolisat (Ward, 1985). Beberapa enzim protease komersial yang banyak dikenal adalah papain dan bromelin dari nanas. Mikroorganisme sebagai sumber enzim protease telah banyak dieksplorasi (Perangin-angin dkk., 1997).

Saat ini penggunaan enzim sebagai pakan tambahan telah dilakukan untuk campuran pakan ternak monogastrik. Penambahan enzim hidrolitis terbukti mempertinggi nilai daya cerna, sehingga meningkatkan juga efisiensi bahan dan akhirnya mengurangi kebutuhan

pakan. Penggunaan protease, phitase, amilase, dan mananase terbukti memberikan peningkatan nilai ekonomis pada usaha ayam pedaging (Tresnawati, 1998).

Protein yang merupakan molekul organik penyusun sel yang sangat penting dan disusun oleh asam-asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida (Mc Donald dkk., 2002). Protein yang terkandung dalam bahan pakan ataupun ransum ternak unggas tidak semata-mata dinilai dari jumlahnya, tetapi yang utama adalah kualitas dari protein tersebut. Kualitas protein bahan pakan ternak unggas tidak hanya bergantung pada jumlah dan imbalan dari asam-asam amino yang terkandung di dalamnya, tetapi juga bergantung pada nilai pencernaan (*digestibility value*) dan nilai ketersediannya (*availability value*) (Zuprizal, 2006).

Hasil penelitian Ambarwati (1990) menunjukkan bahwa pemberian enzim pada ayam pedaging dapat meningkatkan pertumbuhan dan biometri tubuh. Menurut Hartati (1996) pemberian enzim dengan konsentrasi 0,1 % dari jumlah ransum dapat meningkatkan secara nyata pertumbuhan maupun produktivitas telur, namun pada konsentrasi 0,05 % tidak memberikan respon secara nyata. Penggunaan enzim juga dapat menekan konsumsi pakan.

Penggunaan protease pada pakan ternak dapat membantu meningkatkan pencernaan protein oleh ayam broiler. Protease ditambahkan pada pakan ternak dengan tujuan untuk meningkatkan hidrolisis protein, sehingga mampu meningkatkan pemanfaatan nitrogen (Oxenboll dkk., 2011). Menurut Wahyu (1997) tingkat retensi nitrogen pada unggas dipengaruhi oleh kelengkapan dan keseimbangan asam amino, dan bila kualitas protein rendah karena kekurangan salah satu asam amino maka retensi nitrogen akan rendah pula. Kualitas protein yang baik adalah tersedianya dan seimbangnyanya asam amino esensial termasuk lisin, methionin dan triptophan.

2.2 Bakteri-Bakteri Penghasil Protease

Terjadi peningkatan lebih pesat pada dasawarsa terakhir ini dalam pemakaian enzim karena sifatnya yang efisien, selektif, mengkatalisis reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan. Salah satu sumber protease adalah mikroorganismenya. Protease mikroorganismenya dapat diklasifikasikan sebagai protease serin (E.C. 3.4.21), protease sulfhydryl (E.C.3.4.22), protease asam (E.C.3.4.23) dan metaloprotease

(E.C.3.4.24). Beberapa mikroorganisme yang telah diketahui sebagai penghasil protease untuk aplikasi komersial adalah *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pyrococcus*, *Termonospora*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia* dan *Aspergillus* (Rao dkk., 1998; Ward, 2009).

Rao dkk. (1998) menyatakan bahwa protease bakteri secara ekstensif digunakan dalam industri deterjen yang jumlahnya mencapai 25 % dari total enzim yang dijual di dunia. Dimulai tahun 1993, ekstrak kasar protease ditambahkan pada deterjen *laundry* untuk mencapai hasil yang lebih baik dalam menghilangkan noda *proteinaceous*. Akhir tahun 1950, protease bakteri pertama kali digunakan dalam deterjen komersil. Menurut Kompiani (2009) *Bacillus* sp. diketahui merupakan penghasil protease yang baik, sehingga banyak protease komersial yang diproduksi oleh *Bacillus* sp.. Saat ini protease paling populer digunakan dalam deterjen yang semuanya tergolong protease serin dari *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus lentus* (Rao dkk., 1998).

Bakteri proteolitik saat ini juga banyak digunakan sebagai probiotik untuk hewan ternak. Probiotik merupakan imbuhan pakan yang mengandung mikroorganisme hidup yang keberadaannya dapat memperbaiki keseimbangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan (Daud dkk., 2007). Menurut Arslan & Saattci (2004) penambahan probiotik pada ransum mempunyai dampak positif pada pertumbuhan, produksi telur, efisiensi penggunaan pakan, mampu menetralkan toksin yang dihasilkan bakteri patogen, menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan mencegah kolonisasi di dinding usus halus. Abun (2008) mengatakan bahwa pemberian probiotik mampu meningkatkan performa ternak. Menurut Kompiani (2009) salah satu mikroorganisme yang sering digunakan sebagai probiotik adalah *Bacillus* sp. karena diketahui mampu menghasilkan protease yang dapat memutus ikatan peptida, sehingga meningkatkan penyerapan nutrisi oleh ayam.

2.3 Ampas Tahu dan Bekatul sebagai Sumber Protein Bagi Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Menurut Nugraheni (2008) dampak negatif industrialisasi adalah bertambahnya volume limbah yang dapat menurunkan kualitas lingkungan apabila ditangani dengan cara yang tidak tepat. Salah satu industri yang menjadi sumber mata pencaharian masyarakat Indonesia

adalah industri pembuatan tahu. Tahu merupakan makanan tradisional masyarakat Indonesia. Seiring dengan bertambahnya kapasitas produksi, industri tahu akan selalu memberikan dampak berupa limbah yang dapat berupa limbah padat (ampas) dan limbah cair.

Proses pembuatan tahu akan diperoleh hasil samping yaitu ampas tahu yang berupa padatan putih. Hanya sebagian protein yang dapat diekstrak dari proses pembuatan tahu dan sebagian protein masih tertinggal di ampasnya. Kadar protein dalam ampas tahu bergantung pada penggilingan, perlakuan untuk penyaringan dan efisiensi penyaringan. Semakin efisien mesin penggiling, maka semakin banyak protein yang bisa diekstrak dari kedelainya. Ampas tahu masih mengandung protein sebesar 21,16 % dengan kadar air 13,21 % (Lahoni, 2003), sedangkan menurut Shurtleff & Ayogi (1979) ampas tahu masih mengandung 17 % dari jumlah protein kedelai.

Ampas tahu biasanya dalam bentuk semi solid, dengan kandungan air yang cukup tinggi. Kandungan zat makanan ampas tahu sangat bervariasi, bergantung pada cara yang digunakan dalam pembuatannya. Kadar protein kasar ampas tahu cukup tinggi, yaitu 23-29 % dari bahan kering (Mathius & Sinurat, 2001).

Tabel 1. Kandungan zat makanan ampas tahu

Zat Makanan (%)	1	2
Protein Kasar	23,7	21,3-27
Lemak Kasar	10,1	4,5-17
Serat Kasar	23,6	16-23

(1: Siregar, 1995; 2: Kompiang, 1997)

Menurut Nugraheni (2008) saat ini dampak dari limbah padat industri pembuatan tahu belum banyak dirasakan karena telah banyak upaya untuk memanfaatkannya menjadi produk lain yang jenisnya masih sangat terbatas, misalnya pakan ternak, tempe gembus dan oncom. Upaya lain diperlukan untuk pengembangan produk baru dalam memanfaatkan ampas tahu tersebut. Salah satunya dengan mengisolasi protease yang diproduksi oleh bakteri yang mampu memanfaatkan protein yang terdapat pada ampas tahu.

Zuprizal dkk. (1992) melaporkan bahwa dari beberapa sumber protein nabati yang lazim digunakan untuk dibuat sebagai pakan ternak unggas yaitu bungkil kedelai (*soybean meal*) yang memiliki nilai nutritif

hampir sama dengan bahan pakan dari sumber protein hewani. Nilai pencernaan protein bungkil kedelai bagi ternak unggas, misalnya ayam *broiler* sebesar 85 % dan pencernaan terhadap asam amino lisin sebesar 87 %. Tingginya nilai nutritif ini yang menjadikan bungkil kedelai hanya satu-satunya bahan yang dijadikan sumber utama untuk memproduksi pakan ternak unggas. Kebergantungan industri pakan ternak unggas terhadap bungkil kedelai ini akan menjadi persoalan penting untuk dipecahkan.

Salah satu bahan pakan ternak lain yang dapat digunakan untuk menunjang produksi bahan pakan ternak skala industri di Indonesia yaitu bekatul. Menurut Nursalim & Razali (2007) bekatul adalah lapisan luar dari beras yang terlepas saat proses penggilingan gabah. Bekatul umumnya berwarna krem atau coklat muda. Kulit padi terdiri atas kulit bagian terluar dan bekatul yang merupakan kulit bagian dalam atau selaput biji. Bekatul terdiri atas beberapa lapisan yaitu *pericarp*, *seed coat*, *nucellus* dan *aleurone*. Secara umum proses penggilingan padi menghasilkan bekatul sebanyak 8-12 % dari total bobot padi yang digiling, sehingga produksi bekatul halus dari penggilingan padi di Indonesia mencapai 4-6 juta ton per tahun.

Tabel 2. Komposisi kimia bekatul

Komponen	Konsentrasi (%)
Abu	1,60
Serat Kasar	1,69
Lemak Kasar	1,09
Protein Kasar	8,77
Karbohidrat	84,36

(Nursalim & Razali, 2007)

2.4 Pengujian Aktivitas Protease

Aktivitas protease bakteri proteolitik secara kualitatif dilakukan dengan cara satu oose isolat bakteri digpreskan pada permukaan media *milk agar* lalu diinkubasikan pada suhu ruang selama 24-48 jam. Aktivitas protease dari bakteri proteolitik dalam mendegradasi protein ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Putri, 2012). Menurut Harringan dkk., 1966 dalam Naidu & Devi (2005) aktivitas protease secara kualitatif juga dapat diuji dengan cara satu gram sampel disuspensikan dalam 100 mL akuades steril, diinkubasi menggunakan

shaker pada suhu 50 °C. Sampel sebanyak 0,2 mL disebar pada media kasein (media *nutrient agar* dengan 1 % kasein) dan diinkubasikan pada suhu 30 °C selama tujuh hari. Sampel dipindahkan ke cawan petri yang berisi *nutrient agar* dengan 0,4 % gelatin. Cawan petri yang berisi isolat bakteri proteolitik digenangi dengan 1 % *tannic acid* dan diamati adanya zona bening di sekitar koloni.

Pengukuran aktivitas protease secara kuantitatif dapat dilakukan berdasarkan metode Bergmeyer & Grassl (1983). Prinsip kerja dari metode ini yaitu kasein yang berfungsi sebagai substrat akan dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino. Laju pembentukan peptida dan asam amino akan dijadikan dasar sebagai aktivitas protease. Asam-asam amino yang terbentuk harus dipisahkan dari substrat yang tidak mengalami hidrolisis. Umumnya reaksi protease dan substratnya dapat dihentikan dengan menambahkan TCA (*trichloro acetic acid*) yang dapat menyebabkan produk yang mengandung peptida dan asam amino akan terlarut di dalamnya, sedangkan protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap. TCA juga berfungsi untuk menonaktifkan enzim protease, asam-asam amino triptofan yang larut dalam TCA akan bereaksi dengan reagen folin menghasilkan warna biru. Penambahan NaCO₃ bertujuan untuk mendapatkan pH sekitar 11,5 yang merupakan pH optimum untuk intensitas dan stabilitas warna (Novo, 1991). Warna yang terbentuk diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis.

Pengukuran aktivitas proteolitik juga dapat dilakukan menurut metode Enggel dkk. (2004) yaitu sebanyak 0,25 mL larutan protease ditambahkan dengan 0,25 mL larutan buffer fosfat pH 7 dan dipreinkubasi pada suhu 37 °C selama lima menit. Suspensi enzim ditambahkan dengan 0,25 ml substrat (2 % kasein dalam buffer fosfat pH 7) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 mL 0,4 M TCA yang selanjutnya disentrifugasi untuk diambil supernatannya. Sebanyak 0,2 mL supernatan ditambahkan dengan 1 mL 0,5 M natrium karbonat, dipreinkubasi selama 10 menit, ditambahkan dengan 0,2 mL *reagen folin ciocalteau* dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Suspensi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.

Aktivitas spesifik adalah satu Unit enzim per miligram protein (Wirahadikusumah, 1989). Nilai aktivitas spesifik tersebut dapat

digunakan sebagai ukuran besarnya kemurnian enzim hasil isolasi (Lehninger, 1994). Satu Unit aktivitas protease dapat didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu menghasilkan satu mikromol tirosin per menit. Analisis protease dapat mengikuti metode yang dikemukakan Walter (1984), sedangkan untuk mengetahui berat molekul protein enzim tersebut dapat menggunakan elektroforesis SDS-PAGE metode Laemmli (1970) selanjutnya untuk memastikan bahwa pita protein tersebut merupakan suatu enzim dapat digunakan analisis Zymogram.

Aktivitas enzim protease dinyatakan dalam Unit/mL. Satu Unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai banyaknya protease (mL) yang dibutuhkan untuk menghasilkan satu miligram tirosin dalam setiap menit dari substrat kasein 1 % (w/v). Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menginterpolasikan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan linear kurva standar tirosin (Nakanishi dkk., 1974).

Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein yang dapat ditentukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 275 nm. Menurut Sulastri (2008) nilai 275 nm merupakan panjang gelombang maksimum untuk penyerapan sinar UV oleh asam amino aromatik seperti tirosin, triptofan, dan fenilalanin. Larutan yang mengandung sedikit asam amino aromatik mempunyai kemampuan absorbansi yang rendah pada panjang gelombang 275 nm.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada September 2012 hingga Februari 2013. Penelitian bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Proteolitik dari Ampas Tahu

Bakteri proteolitik diisolasi dengan cara ampas tahu yang diperoleh dari pabrik tahu 73 Sukun-Malang sebanyak lima gram dimasukkan ke dalam 45 ml NaCl 0,85 %. Suspensi dihomogenasi menggunakan vorteks. Suspensi larutan diambil sebanyak satu mililiter dan dimasukkan ke dalam sembilan mililiter NaCl 0,85 % untuk memperoleh seri pengenceran 10^{-2} . Suspensi larutan diencerkan hingga mencapai seri pengenceran 10^{-6} di dalam tabung reaksi berisi 9 mL NaCl 0,85 % dan dilakukan penggantian pipet volume setiap pengencerannya. Suspensi larutan dari masing-masing pengenceran diambil sebanyak 0,1 mL dan ditumbuhkan pada medium selektif, yaitu media *calcium caseinate agar* (CCA) dengan metode *pour plate*. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah koloni bakteri proteolitik tumbuh pada media CCA, dilanjutkan dengan pengamatan koloni bakteri terpilih yaitu koloni bakteri yang menghasilkan zona bening pada media CCA (Cappucino, 1983 dalam Libertina, 2009).

Bakteri proteolitik dimurnikan dengan cara koloni bakteri tunggal yang berbeda dan menghasilkan zona bening pada media CCA diinokulasikan pada media CCA menggunakan metode dilusi dan dilanjutkan dengan *spread plate*. Bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam hingga diperoleh koloni tunggal. Koloni tunggal bakteri ditumbuhkan pada media *agar slant* sebagai stok dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, kemudian disimpan dalam *refrigerator*.

3.3 Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri proteolitik dikarakterisasi dengan pengamatan karakter morfologi koloni yang dilakukan untuk membedakan antarkoloni. Karakter morfologi yang diamati diantaranya, bentuk

keseluruhan koloni, konfigurasi, margin, elevasi, tekstur, konsistensi, ciri optik, pigmentasi dan diameter koloni. Karakterisasi terhadap isolat bakteri juga dilakukan secara mikroskopis dengan metode pewarnaan Gram, endospora, penghitungan panjang sel bakteri, serta uji katalase dan oksidase.

Menurut Smith & Marise (2005) pewarnaan Gram dilakukan dengan cara isolat bakteri proteolitik pada *nutrient agar* (NA) miring berumur 24 jam diambil satu oose dan dioleskan sambil diratakan pada gelas obyek yang sebelumnya telah ditetesi dengan akuades steril. Isolat bakteri pada gelas obyek difiksasi diatas api hingga membentuk apusan. Apusan ditetesi dengan larutan Gram A (*Hucker's crystal violet*) selama satu menit, kemudian dibilas dengan air. Apusan dikeringanginkan dan selanjutnya ditetesi dengan Gram B (*Lugol's iodine*) selama satu menit. Apusan bakteri dicuci kembali pada air mengalir dan dikeringanginkan. Apusan bakteri selanjutnya ditetesi dengan Gram C (alkohol) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Apusan bakteri ditetesi dengan Gram D (safranin) dan dibiarkan selama satu menit, dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Apusan bakteri pada gelas obyek kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi.

Menurut Smith & Marise (2007) pewarnaan endospora dilakukan dengan membuat apusan bakteri, yaitu dengan mengambil satu oose isolat bakteri dari NA miring berumur 48. Isolat diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi dengan akuades steril, kemudian diratakan. Gelas obyek difiksasi diatas api. Apusan ditutup dengan kertas saring dan diletakkan diatas penangas air. Apusan ditetesi dengan pewarna hijau malakit (*malachite green*) selama 10 menit, serta dijaga agar pewarna tidak mengering dengan cara menambahkan pewarna hingga kertas saring selalu basah. Apusan bakteri dicuci dengan air mengalir secara hati-hati hingga sisa pewarna luntur. Gelas obyek kemudian ditetesi dengan safranin (Gram D) selama 30 detik, dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Obyek diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi.

Isolat bakteri proteolitik juga dikarakterisasi menggunakan uji katalase dan uji oksidase. Uji katalase dilakukan dengan cara isolat bakteri proteolitik diambil satu oose dari media NA miring yang berumur 24 jam dan diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi dengan akuades steril. Gelas obyek kemudian ditetesi dengan hidrogen

peroksida (H_2O_2) 3 % sebanyak satu tetes (Fardiaz, 1993). Uji oksidase dilakukan dengan cara satu oose isolat murni bakteri berumur 24 jam dioleskan pada kertas uji oksidase (*bactident oxidase test kit*). Kertas uji oksidase diamati perubahan warnanya setelah 60 detik (Widyakusuma, 2007).

3.4 Uji Kualitatif Aktivitas Protease dari Isolat Bakteri Proteolitik

Menurut Amelia dkk. (2005) aktivitas bakteri proteolitik dapat dideteksi dengan cara isolat murni bakteri proteolitik umur 24 jam ditotol menggunakan jarum oose pada media CCA dalam cawan petri. Isolat bakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Koloni bakteri yang tumbuh diukur luasan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dengan menggunakan jangka sorong.

3.5 Uji Patogenisitas

Menurut Chang (2000) uji patogenisitas dilakukan dengan cara menginokulasikan satu oose kultur murni bakteri berumur 24 jam pada media *blood agar* dengan metode *streak*. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Menurut Johnson (2001) adanya zona bening di sekitar koloni menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut dapat menghemolisis sel darah merah (eritrosit) dengan menghasilkan enzim hemolisin . Eritrosit digunakan sebagai nutrisi untuk mendukung pertumbuhan bakteri tersebut. Hal ini merupakan indikasi bahwa bakteri bersifat patogen terhadap inang.

3.6 Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Proteolitik pada Media Bekatul

Kurva Pertumbuhan bakteri menurut Madigan dkk. (2003) dibuat dengan cara starter bakteri proteolitik dari ampas tahu sebanyak lima mililiter diinokulasikan ke dalam 45 mL media bekatul sebagai stok inokulum, kemudian dihomogenkan. Isolat bakteri kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya sebanyak 15 mL stok inokulum (mengandung 10^7 sel/mL bakteri) ditambahkan pada 135 mL media bekatul sebagai media produksi. Suspensi bakteri kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm, suhu 37 °C. Sampel bakteri diambil pada jam ke 0, 1, 2, 4, 6, 10, 14, 18, 24 dan 48. Setiap titik pengambilan sampel

dilakukan penghitungan jumlah sel bakteri menggunakan hemositometer. Hasil penghitungan jumlah sel bakteri digunakan sebagai acuan dalam pembuatan kurva pertumbuhan.

3.7 Deteksi Aktivitas Protease Isolat Bakteri TP5K1 dan TP6K5 pada Substrat Bekatul

Aktivitas proteolitik dideteksi berdasarkan modifikasi metode Enggel dkk. (2004). Sebanyak lima mililiter sampel bakteri pada media produksi pada jam ke 0, 1, 2, 4, 6, 10, 14, 18, 24 dan 48 disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dan suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim kasar protease (*crude enzyme*). Supernatan sebanyak 500 µL ditambahkan dengan 500 µL larutan 0,05 M buffer fosfat pH 7. Suspensi kemudian dilakukan preinkubasi pada suhu 37 °C selama lima menit dan ditambahkan 500 µL substrat (dua persen kasein dalam 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7). Larutan enzim diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan satu mililiter 0,4 M asam trikloroasetat (TCA) dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm, selama 15 menit, pada suhu 4 °C. Supernatan (*crude enzyme*) diambil sebanyak satu mililiter, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diencerkan dengan Tris HCl hingga total volume menjadi dua mililiter. Larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm. Menurut Novita dkk. (2006) Unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah protease yang dapat mengkatalisis reaksi pelepasan 1 µmol tirosin per menit. Nilai aktivitas diukur dari kadar tirosin yang diperoleh terhadap kurva baku tirosin sesuai dengan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = [\text{tirosin}] \times \frac{v}{p \times q} \times fp \dots\dots\dots (1)$$

keterangan:

- v = volume total sampel percobaan pada tiap tabung (mL)
- p = jumlah enzim (mL)
- q = waktu inkubasi (menit)
- fp = faktor pengenceran

3.8 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Aktivitas protease secara kualitatif dan kuantitatif dilakukan menurut Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga kali pengulangan. Data aktivitas proteolitik secara kualitatif dianalisis menggunakan uji Games-Howell dan Brown-Forsythe ($\alpha = 0,05$). Data aktivitas protease secara kuantitatif dari masing-masing isolat bakteri pada substrat bekatul 2 % dianalisis menggunakan uji *Independent Sample T-Test* ($\alpha = 0,05$).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

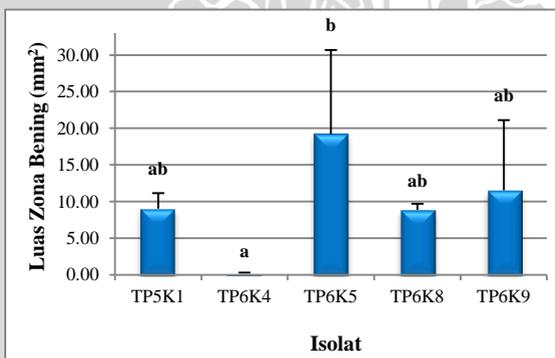


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

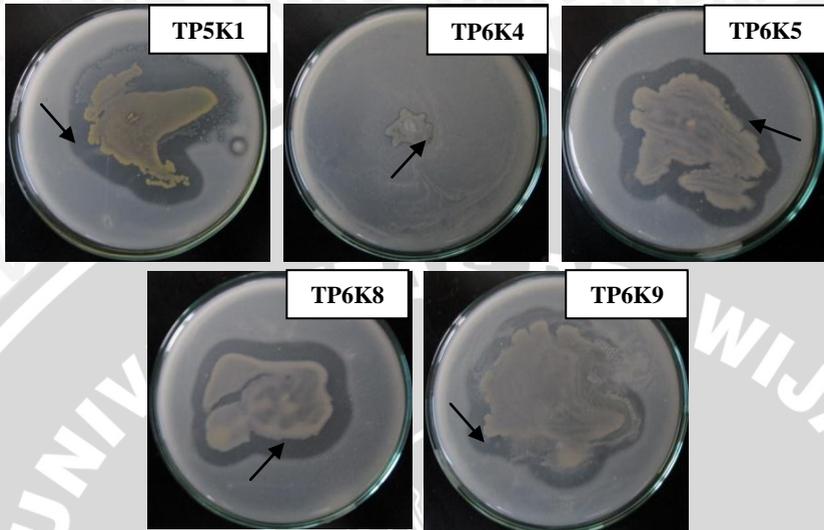
4.1 Karakteristik Isolat Bakteri Proteolitik Hasil Isolasi dari Ampas Tahu

Isolat bakteri proteolitik yang diisolasi dari ampas tahu diperoleh sebanyak 10 isolat, yaitu isolat TP5K1, TP6K2, TP6K3, TP6K4, TP6K5, TP6K6, TP6K7, TP6K8, TP6K9 dan TP7K10. Isolat bakteri diseleksi dengan pengujian aktivitas proteolitik secara kualitatif menggunakan media CCA dan dipilih isolat bakteri yang mampu menghasilkan zona bening. Hasil uji aktivitas proteolitik secara kualitatif menunjukkan bahwa terdapat lima isolat yang menghasilkan zona bening di sekitar koloni yaitu isolat TP5K1, TP6K4, TP6K5, TP6K8 dan TP6K9 (Gambar 3). Adanya aktivitas protease ekstraselular bakteri menyebabkan kasein pada media terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino yang larut. Hilangnya partikel kasein dalam media ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Zona bening merupakan indikator bahwa kelima isolat bakteri tersebut mampu merombak kasein dalam media sebagai sumber nutrisinya (Widhyastuti & Dewi, 2001).

Uji kualitatif menunjukkan bahwa isolat TP6K4 memiliki luas zona bening yang paling kecil, sedangkan isolat TP6K5 memiliki luas zona bening yang paling besar. Isolat TP5K1, TP6K8 dan TP6K9 memiliki luas zona bening yang cenderung sama dengan isolat TP6K4 dan isolat TP6K5 ($p < 0,05$) (Gambar 2).



Gambar 2. Luas zona bening isolat bakteri proteolitik pada media CCA (inkubasi suhu 37 °C selama 24 jam)



Gambar 3. Zona bening isolat bakteri proteolitik pada media CCA, (inkubasi suhu 37 °C selama 24 jam; → : zona bening koloni bakteri)

Isolat bakteri TP5K1, TP6K4, TP6K5, TP6K8 dan TP6K9 memiliki kemampuan yang bervariasi dalam menghidrolisis kasein pada media CCA yang ditunjukkan dengan zona bening yang terbentuk (Gambar 3). Pembentukan zona bening pada setiap isolat bakteri proteolitik dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan media. Aktivitas protease dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah pH, konsentrasi substrat dan enzim, suhu serta adanya aktivator dan inhibitor. Walaupun demikian, metode kualitatif tidak selalu menjadi dasar yang baik untuk mengetahui aktivitas enzimatik bakteri, sehingga perlu adanya uji lanjutan pengukuran terhadap aktivitas protease (Lehninger, 2005).

Isolat TP5K1, TP6K4, TP6K5, TP6K8 dan TP6K9 diamati morfologinya secara makroskopis maupun mikroskopis. Kelima isolat terpilih tersebut memiliki perbedaan karakter satu sama lain (Lampiran LT3.). Karakterisasi mikroskopis terhadap lima isolat terpilih meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, pengukuran panjang sel bakteri, uji katalase dan uji oksidase. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat TP5K1 merupakan bakteri berbentuk batang ($p = 1,5 \mu\text{m}$),

TP6K4 berbentuk batang ($p = 2 \mu\text{m}$), TP6K5 berbentuk bulat ($p = 1 \mu\text{m}$), TP6K8 berbentuk batang ($p = 1,5 \mu\text{m}$) dan TP6K9 berbentuk bulat ($p = 1,5 \mu\text{m}$). Kelima isolat tersebut merupakan Gram positif dan isolat TP6K4 positif membentuk endospora (Gambar 4. & Tabel 3.).

Tabel 3. Karakteristik isolat bakteri proteolitik terpilih

No.	Karakteristik	Isolat				
		TP5K1	TP6K4	TP6K5	TP6K8	TP6K9
1.	Gram	+	+	+	+	+
2.	Endospora	-	+	-	-	-
3.	Katalase	+	+	+	+	+
4.	Oksidase	-	-	-	-	-
5.	Hidrolisis protein	+	+	+	+	+
6.	Patogenisitas	-	+	-	+	+

Keterangan

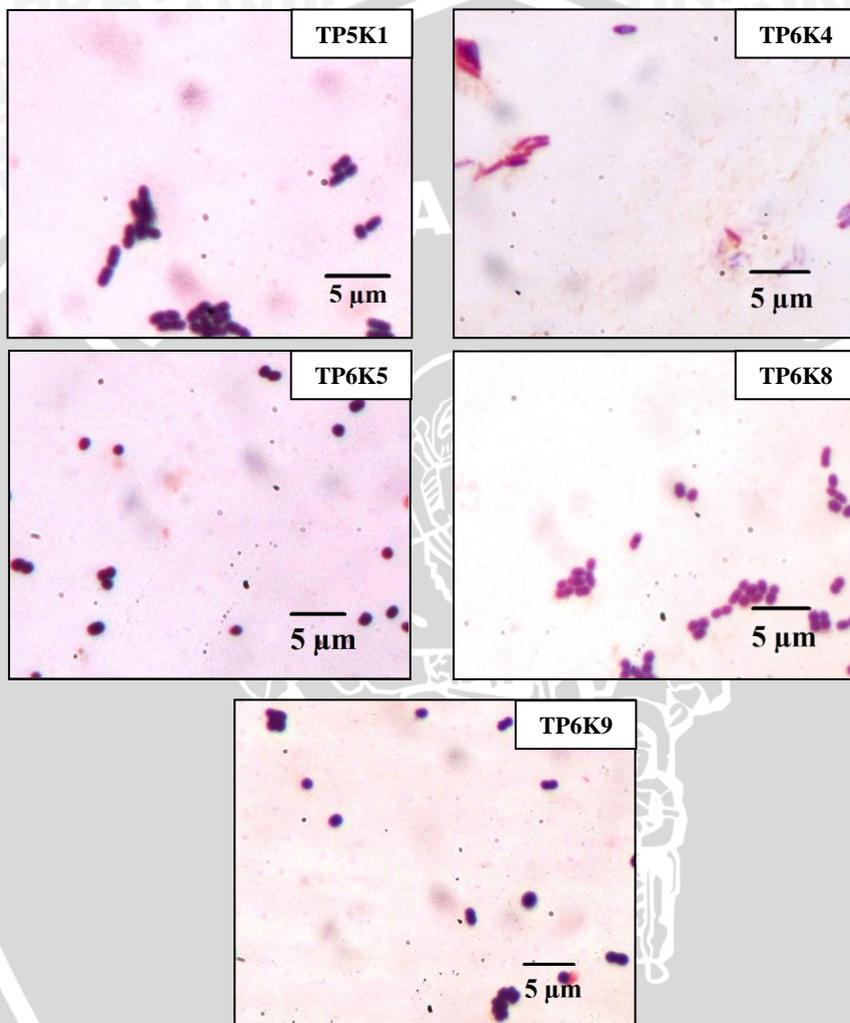
+ : reaksi positif

- : reaksi negatif

Isolat TP5K1, TP6K4, TP6K5, TP6K8 dan TP6K9 menunjukkan hasil positif pada uji katalase dan merupakan bakteri yang bersifat aerob. Uji katalase digunakan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan katalase, serta untuk mengetahui toleransi bakteri terhadap oksigen. Apabila terbentuk gelembung udara, maka uji katalase dinyatakan positif. Bakteri aerob memberikan reaksi yang positif terhadap uji katalase, sedangkan bakteri anaerob menunjukkan reaksi negatif (Fardiaz, 1993; Marlina, 2009).

Hasil menunjukkan bahwa isolat TP5K1, TP6K4, TP6K5, TP6K8 dan TP6K9 merupakan bakteri yang tidak mampu menghasilkan enzim oksidase. Uji oksidase digunakan untuk menentukan bakteri enterik atau non enterik. Enzim sitokrom oksidase akan berubah menjadi bentuk tidak aktif dengan mereduksi sitokrom C dan akan kembali berubah menjadi aktif jika terjadi transfer elektron ke molekul oksigen. Keberadaan oksigen akan mereduksi substansi-substansi organik diantaranya substansi yang terdapat pada *oxidase test strip* yang mengandung N, N-dimetil-1,4-fenilen diammonium diklorida dan 1-naftol. Reaksi tersebut akan menghasilkan molekul *indophenol blue* yang mengakibatkan warna *oxidase test strip* akan berwarna biru. Ini

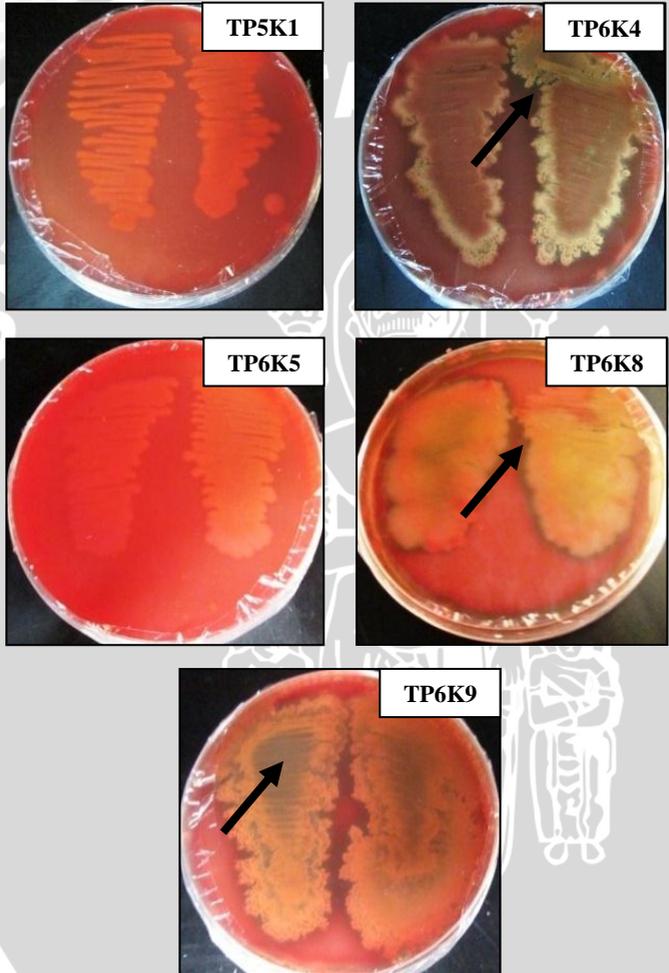
merupakan reaksi positif untuk bakteri non enterik, sedangkan pada bakteri enterik tidak terjadi perubahan warna (Marlina, 2009).



Gambar 4. Hasil pewarnaan Gram isolat bakteri proteolitik ampas tahu

Hasil penelitian Saxena & Singh (2011) menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. yang memiliki aktivitas proteolitik pada media bekatul memiliki ciri-ciri yaitu Gram positif, membentuk endospora,

berbentuk batang dan mampu menghidrolisis protein pada media agar skim. Selain itu, bakteri proteolitik menunjukkan hasil positif pada uji katalase dan negatif pada uji oksidase (Naiola & Widhyastuti, 2007). Berdasarkan hal tersebut isolat bakteri TP6K4 memiliki karakteristik yang paling mendekati ciri-ciri bakteri proteolitik dari genus *Bacillus*.



Gambar 5. Hasil uji patogenisitas isolat bakteri proteolitik pada media *blood agar* (inkubasi suhu 37 °C selama 48 jam; → : zona bening koloni bakteri)

Isolat bakteri proteolitik asal ampas tahu yang telah diperoleh diharapkan dapat diaplikasikan pada pakan ternak. Oleh sebab itu perlu dilakukan pengujian patogenisitas. Isolat TP6K4, TP6K8 dan TP6K9 bersifat patogen yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Gambar 5 B, D dan E). Bakteri tersebut memiliki enzim hemolisin yang mampu memecah sel darah merah secara total yang menunjukkan hemolisis β . Zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat patogen (Budijono dkk., 2012; Port, 2008).

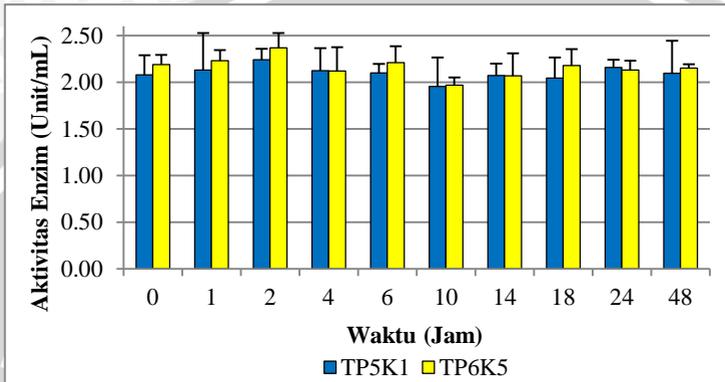
Isolat TP5K1 dan TP6K5 tidak menunjukkan aktivitas hemolisis yang ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni setelah masa inkubasi 48 jam (Gambar 5 A dan C). Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut tidak bersifat patogen. Bakteri yang tidak menunjukkan adanya zona bening pada media *blood agar* termasuk dalam hemolisis γ , yaitu bakteri tidak mampu menghemolisis atau tidak dapat bereaksi dengan sel darah merah. Reaksi tersebut ditandai dengan tidak adanya perubahan pada warna media, sehingga bakteri ini tidak termasuk bakteri patogen (Port, 2008).

4.2 Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat Bakteri Proteolitik Terpilih pada Media Bekatul 2 %

Pola pertumbuhan isolat bakteri TP5K1 dan TP6K5 dapat diketahui melalui kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan dibuat menggunakan media bekatul yang merupakan salah satu bahan baku pakan ternak. Sumantha dkk. (2006) & Anto dkk. (2006) menyatakan bahwa bekatul dapat digunakan sebagai substrat fermentasi untuk memproduksi enzim protease, amilase dan lipase. Bekatul yang digunakan berasal dari penggilingan padi IR 64 yang diperoleh dari daerah Gondanglegi, Malang, Jawa Timur. Berdasarkan hasil analisis proksimat, bekatul yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kandungan protein sebesar 6,32 % (Lampiran LT2.).

Aktivitas protease isolat bakteri TP5K1 dan TP6K5 tidak berbeda selama masa inkubasi ($p > 0,05$) (Gambar 6). Aktivitas protease tertinggi isolat TP5K1 terjadi pada jam kedua yaitu sebesar 2,24 Unit/mL. Aktivitas protease tersebut terjadi pada awal fase logaritmik dengan jumlah sel sebesar $7,64 \times 10^7$ sel/mL (Gambar 7). Bakteri menghasilkan aktivitas proteolitik yang tinggi pada fase logaritmik, hal ini disebabkan masih tersedianya nutrisi dalam jumlah besar yang diperlukan sel

bakteri untuk melakukan metabolisme sel. Terjadinya penurunan aktivitas proteolitik disebabkan berkurangnya jumlah substrat yang tersedia pada media dan akan menghambat pembentukan kompleks enzim substrat dan menyebabkan penurunan laju katalitik (Putri, 2012).

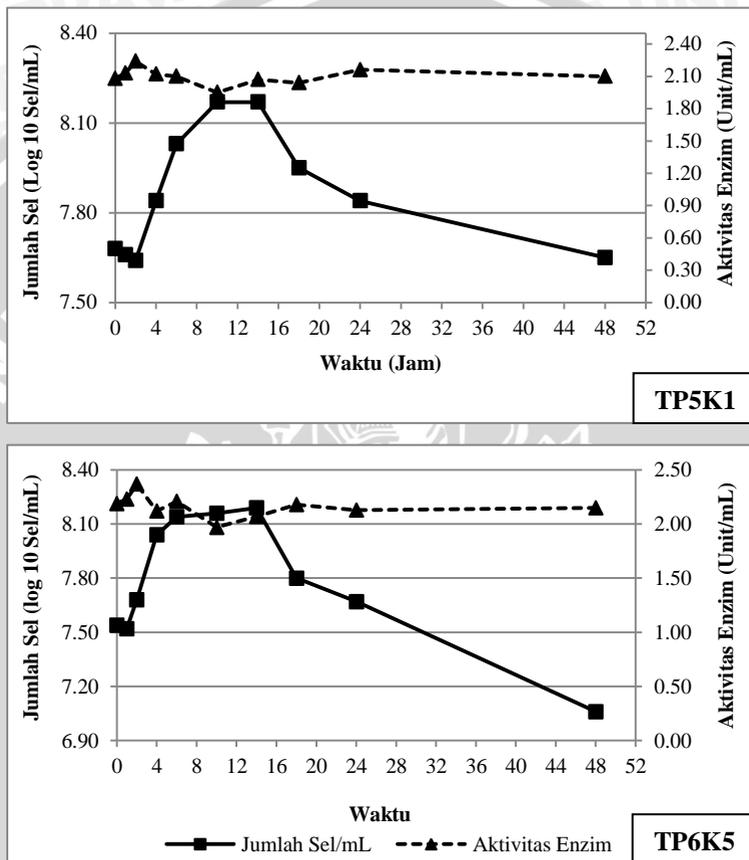


Gambar 6. Aktivitas protease isolat TP5K1 dan TP6K5 pada media bekatul 2 %

Aktivitas protease isolat TP5K1 mengalami penurunan hingga jam ke 10 dan kembali naik pada jam ke 24 (Gambar 7.). Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa aktivitas protease isolat TP5K1 pada media bekatul 2 % jam ke 10 turun menjadi 1,95 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri sebanyak $8,17 \times 10^8$ CFU/mL. Rendahnya aktivitas protease pada fase logaritmik dapat disebabkan nutrisi yang tersedia pada media telah habis digunakan untuk tumbuh, sehingga substrat yang dibutuhkan untuk melakukan aktivitas proteolitik juga semakin rendah. Aktivitas kembali naik setelah mengalami penurunan, hal ini dimungkinkan terjadi pemanfaatan protease yang telah diproduksi sebagai sumber nutrisi baru untuk melakukan aktivitas proteolitik.

Hasil yang serupa juga ditemui pada isolat TP6K5. Aktivitas protease tertinggi terjadi pada fase logaritmik yaitu pada jam kedua sebesar 2,37 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri sebesar $7,68 \times 10^7$ sel/mL (Gambar 7.). Aktivitas protease turun pada jam keempat menjadi 2,12 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri sebanyak $8,04 \times 10^7$ CFU/mL. Aktivitas protease kembali mengalami kenaikan pada jam keenam kemudian turun dan akhirnya konstan setelah akhir fase stasioner terjadi

(Gambar 7). Protease ekstraselular dari *Bacillus* sp. biasanya dihasilkan pada akhir fase logaritmik (Ward, 1985).



Gambar 7. Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease dari isolat bakteri proteolitik pada media bekatul 2 %

Aktivitas protease yang dihasilkan oleh isolat TP5K1 dan TP6K5 relatif rendah. Aktivitas protease yang rendah dari isolat-isolat tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi protein yang terdapat pada substrat (bekatul), waktu inkubasi dan konsentrasi inokulum. Penelitian Saxena & Singh (2011) menunjukkan bahwa aktivitas protease dari *Bacillus* sp. pada substrat bekatul dengan

konsentrasi 50 % mampu mencapai 972 U/g setelah jam ke 72 dengan 20 % starter bakteri. Penelitian Naidu & Devi (2005) juga menunjukkan aktivitas protease yang relatif tinggi yaitu sebesar 42,1 Unit/mL. Aktivitas protease tersebut diperoleh dengan menggunakan substrat bekatul 1 % dan diinkubasi selama 96 jam.

Komposisi media, pH dan aerasi merupakan variabel penting yang memengaruhi produksi enzim pada *submerged fermentation* (Maurer, 2004). Penurunan aktivitas proteolitik bakteri dapat terjadi karena berkurangnya jumlah substrat yang akan menghambat pembentukan kompleks enzim substrat (Pakpahan, 2009). Pola penurunan aktivitas protease yang ditunjukkan oleh isolat TP5K1 dan isolat TP6K5 pada penelitian ini juga dapat dimungkinkan terjadi akibat konsentrasi protein yang terkandung pada media bekatul 2 %. Menurut Pratiwi (2008) aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin cepatnya substrat terikat pada enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik jenuh tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan laju reaksi.

Aktivitas protease isolat TP5K1 dan TP6K5 yang relatif rendah juga dapat disebabkan oleh sifat protease yang dihasilkan. Protease dari mikroorganisme merupakan jenis enzim konstitutif atau inducibel parsial. Enzim konstitutif merupakan enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroorganisme dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif ada dalam jumlah sel yang tidak tetap atau bergantung pada adanya induser. Enzim induktif jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung substrat yang menginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon (Lidya & Djenar, 2000).

Menurut Pelczar & Chan (2005) penurunan aktivitas enzim saat pertumbuhan optimum bakteri telah tercapai juga dapat disebabkan adanya pengendalian aktivitas enzim yang diatur oleh ligan (molekul yang dapat terikat oleh enzim) yang tidak turut berperan dalam proses katalitik. Pengendalian tersebut merupakan proses hambatan arus balik (*feedback inhibition*). Ligan dalam arus balik aktivitas enzimatik merupakan produk akhir yang dapat menghentikan sintesisnya sendiri

dengan cara menghambat aktivitas enzim apabila terjadi akumulasi produk akhir. Produk akhir dari reaksi proteolitik adalah asam amino. Asam amino akan menghambat aktivitas protease jika asam amino yang dihasilkan telah menumpuk, sehingga dapat mengakibatkan aktivitas protease yang dihasilkan menurun.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil isolasi bakteri proteolitik dari ampas tahu diperoleh sepuluh isolat, namun hanya isolat yaitu TP5K1, TP6K4, TP6K5, TP6K8 dan TP6K9 yang menghasilkan zona bening pada uji kualitatif. Isolat TP5K1 dan TP6K5 tidak patogen dan tumbuh dengan baik pada media bekatul 2 %. Aktivitas protease tertinggi isolat TP5K1 dan TP6K5 berturut-turut 2,24 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri $5,13 \times 10^7$ sel/mL dan 2,37 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri $5,26 \times 10^7$ sel/mL.

5.2 Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan melakukan analisis molekuler untuk mengetahui spesies bakteri proteolitik yang telah diketahui menghasilkan aktivitas protease (TP5K1 dan TP6K5). Protease yang dihasilkan oleh bakteri proteolitik juga dapat dikarakterisasi menggunakan analisis SDS-PAGE.



DAFTAR PUSTAKA

- Abun. 2008. Hubungan mikroflora dengan metabolisme dalam saluran pencernaan unggas dan monogastrik. *Makalah Ilmiah*. Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak. Fakultas Peternakan. Universitas Padjajaran. Jatinangor.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*. Vol.9 No.2.
- Akhirany, N. 2011. Pemanfaatan Antibiotik dan Zat Aditif pada Pakan Ternak. http://disnaksulsel.info/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=26&temid=99999999. Diakses tanggal 10 September 2012.
- Ambarwati. 1990 . Pengaruh Pemberian Enzim pada Ransum Terhadap Biometri Tubuh Ayam Pedaging. Fakultas Kedokteran Hewan. UNAIR. Surabaya.
- Amelia, G., Rini, H., Iwan, S., Tatik, K. & Abdul, C. 2005. Isolasi dan pengujian aktivitas enzim amilase dan protease mikroba terasi asal Kalimantan Timur. Laporan Teknik. Bidang Mikrobiologi. Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bogor.
- Anto, H., Trivedi, U. B. & Patel, K. C. 2006. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice bake manufacturing waste products as substrate. *Bioresource Technol.* 97:1161-1166.
- Arslan, C. & M. Saattci. 2004. Effect of probiotic administration either as feed additive or by drinking water on performance and blood parameters of Japanese quail. *Arch. Geflugelk.* 68: 160-163.
- Basuki, W. 1997. Enzim dalam industri detergen. *Proceeding of The 1st Conference on Industrial Enzyme and Biotechnology*. Jakarta. 206-213.
- Bergmeyer, H. U. & Grassl, M. G. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol: II. Verlag Chemie: Weinheim.
- Budiansyah, A. 2004. Pemanfaatan Probiotik dalam Meningkatkan Penampilan Produksi ternak Unggas. *Makalah Sains*. IPB. Bogor.
- Budijono, M. H., Linda, T. M. & Widiarti, W. 2012. Eksplorasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Sampel Air Kolam *Gathering Station* PT. Bumi Siak Pusako Provinsi Riau. Laboratorium Teknologi Pengolahan Limbah MSP FAPERIKA UNH, Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA UNRI & Jurusan Biologi, FMIPA, UNRI.

- Cappuccino, J. G. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Addison-Wesley: USA.
- Chang, Chin-I., Wen-Yu, L. & Chung-Zen, S. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org*. 43:153-157.
- Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments and Sigma-Aldrich*. (19), e899 10.3791/899, DOI:10.3791/899.
- Damayanthi, E., Tjing, L. T & Arbianto, L. 2007. *Rice Bran*. Panebar Swadaya: Depok.
- Daud, M., W. G. Piliang & I. P. Kompiang. 2007. Persentase dan kualitas ayam pedaging yang diberi probiotik dan prebiotik dalam ransum. *JITV*. 12 (3):167-174.
- Enggel, J., Meriandini, A. & Natalia, L. 2004. Karakterisasi protease ekstraseluler *Clostridium bifementans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 9(1): 9-12.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT. Raja Grafindo Persada: Jakarta.
- Gunro, S., Yasa, I. M. D. R., Suyasa, N. & Parwati, I. A. P. 2000. Pengaruh Penggunaan Enzim Terhadap Produktivitas Telur Ayam Buras. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner.
- Hartati, T. 1996. Pengaruh Pemberian Enzim Terhadap Penampilan dan Biometri Usus Halus Ayam Buras. Fakultas Kedokteran Hewan. UNAIR. Surabaya.
- Hartono, N. 1995. Isolasi dan identifikasi mikroorganisme penghasil protease dari ikan. P. 1-4.
- Huang, G., Ying, T., Huo, P. & Jiang, J. 2006. Purification and characterization of a protease from thermophilic *Bacillus* strain HS08. *Biotechnol*. 5:2433-2438.
- Jenni, R. 2003. Program Enzim Selulase-Hemiselulase pada Proses Drinking Kertas. Koran Bekas. *Jurnal Matematika dan Sain*. 8:67-71.
- Johnson, M. T. 2001. Hemolysis on Blood Agar. Indiana University School of Medicine. India.
- Kalisz, H. K. 1988. Microbial Proteinases. *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*. 36:1-65.

- Khattak, F. M., Pasha, T. N., Hayat, Z. & Mahmud, A. 2013. Enzymes in Poultry Nutrition. Department of Poultry Production and Department of Animal Nutrition. University of Veterinary and Animal Sciences. Lahore. Pakistan
- Kompiang, I. P. 2009. Pemanfaatan mikroorganisme sebagai probiotik untuk meningkatkan produksi ternak unggas di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian*. 2(3):177-191.
- Kurniawati, W. 2008. Implementasi hasil penelitian Biologi (penambahan mikrobia penghasil fitase dan protease pada campuran pakan ternak ayam *broiler*) sebagai sumber belajar materi bioteknologi SMA kelas X semester II. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sebelas Maret. Surakarta. Skripsi.
- Laemmli, U. K., Molbert, E., Showe, M. & Kellenberger, E. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 49,99.
- Lahoni, E. 2003. Pengetahuan Bahan Makanan Ternak. Fakultas Peternakan. IPB. Bogor.
- Lehninger, A. L. 1994. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 2*. Erlangga: Jakarta.
- Lehninger, A. L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- Libertina, I. 2009. Uji Aktivitas Protease Ekstraselular Bakteri Proteolitik Usus Burung Puyuh (*Coturnix japonica*) Pada Media Tepung Bungkil Kedelai. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.
- Lidya & Djenar. 2000. Dasar Bioproses Direktorat Pembinaan dan Penolinan dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional: Jakarta.
- Madigan, M. T., Martinko, J. H, Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganism. Tenth Edition*. Pearson Education, Inc.: USA.
- Marlina. 2009. Identifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan metode biolog dan deteksi gen ToxR nya secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. Vol. 13. No. 1.
- Maurer, K. 2004. *Cur. Opin. Biotechnol.* 15: 330-334.

- Mc Donald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D & Morgan, C. A. 2002. *Animal Nutrition Sixth Edition*. Prentice Hall. Pearson Education. Edinburgh Gate, Harlow, Essex CM20 2JE: UK.
- Naidu, K. S. B. & Devi, K. L. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 4 (7):724-726.
- Naiola, E. & Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, seleksi dan optimasi produksi protease dari beberapa isolat bakteri. *Hayati*. 6:467-473.
- Nakanishi, T., Minamiura, N. & Yamamoto, T. 1974. *Agricultural Biological Chemistry*. 38:37-44.
- Novita, W., K. Arief, F. C. Nisa & U. Murdiyatmo. 2006. Karakterisasi parsial ekstrak kasar enzim protease dari *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396. *Jurnal Teknologi Pertanian*, Vol. 7 No. 2:96-105.
- Novo. 1981. *Novo's Handbook of Practical Biotechnology*. Novo. Denmark.
- Nugraheni, M. 2008. Teknologi pemanfaatan limbah padat industri tahu untuk pembuatan kecap ampas tahu. PTBB Fakultas Teknik. UNY. *Inotek*. Vol.2.
- Nursalim, Y & Razali, Z. Y. 2007. *Bekatul Makanan yang Menyehatkan*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Oxenboll, K. M., Pontoppidan, K. & Fru-Nji, F. 2011. Use of a Protease in Poultry Feed Offers Promising Environmental Benefits. *International Journal of Poultry Science*. 10 (11): 842-848.
- Pakpahan, R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Bakteri Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Tesis.
- Pelczar, M. J. & Chan, E. C. S. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
- Perangin-angin, R., S. Amini, N. Retnowati, N. D. & Sabaruddin. 1997. Penelitian mikroba imobil sebagai sumber biokatalis penelitian teknik mikroba imobil penghasil protease dari hasil limbah industri perikanan. Laporan teknik penelitian. Bagian Proyek Penelitian dan Pengembangan Penelitian Perikanan Sliipi. 6 pp.
- Poernomo, A. T. & Djoko D. A. 2003. Uji aktivitas *crude* enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 hasil fermentasi curah. *Majalah Farmasi Erlangga*. 3:103-107.

- Port, T. 2008. Blood Agar (BAP) Bacterial Growth Medium Differential Medium to Identify β -hemolytic *Streptococcus*. <http://suite-101.com>. Diakses tanggal 02 Januari 2013.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga: Jakarta.
- Putri, Y. S. 2012. Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan. Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga. Jurnal Skripsi.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Rev. Sci Am.* 62:597-635.
- Saxena, R. & Singh, R. 2011. Characterization of a metallo-protease produced in solid state fermentation by a newly isolated *Bacillus* strain. *Acta Biologica Szegediensis.* 55(1):13-18.
- Shurtleff, W. & A. Aoyagi. 1979. *The Book of Tempeh, a Super Soy Food from Indonesia*. Harper and Row Pub. New York.
- Siregar, S. 1995. *Sapi Perah: Jenis, Teknik Pemeliharaan dan Analisis Usaha*. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Smith, A. C. & Marise, A. H. 2005. Gram Stain Protocols. <http://www.microbelibrary.org>. Diakses tanggal 10 September 2012.
- Smith, A. C. & Marise, A. H. 2007. Endospore Stain Protocols. <http://www.microbelibrary.org>. Diakses tanggal 10 September 2012.
- Suhartono, M. T. 2000. Eksplorasi protease bakteri asal Indonesia untuk aplikasi industri dan riset bioteknologi. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*:125-133.
- Sulastris, S. 2008. Pemanfaatan Protease dari Akar Nanas pada Proses Pembuatan Virgin Coconut Oil (VCO). ITB.
- Sutandi, C. 2003. Analisis Potensi Enzim Protease Lokal. <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/18310>. Diakses tanggal 21 April 2012.
- Wahju, J. 1997. Ilmu Nutrisi Unggas. Gajah Mada University Press: Yogyakarta.
- Walsh, C. 2012. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman and Co.: San Francisco.
- Walter, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H. U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 270-277.

- Ward, O. P. 1985. Proteinase. In Fogarty WM (ed). Microbial and enzyme biotechnology. *New York: Appl. Science Publ.* 251-290.
- Whitaker, Jr. 1994. *Principle of Enzymology for the Food Science. Edisi ke-2.* Oxford University Pr. New York.
- Widyakusuma, D. 2007. Potensi Konsorsium Strain-Strain Bakteri Anggota *Pseudomonas* Pembentuk Biofilm dalam Mendegradasi *Linear Alkylbenzene Sulfonate* (LAS). Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.
- Widhyastuti, N. & Dewi, R. M. 2001. Isolasi bakteri proteolitik dan optimasi produksi protease. Laporan Teknik Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya Hayati. Pusat penelitian Biologi. LIPI.
- Wirahadikusuma, M., 1989. Biokimia. Institut Teknologi Bandung. Jawa Barat.
- Zuprizal, Larbier, M. & Chagneau, A. M. 1992. Effect of age and sex on true digestibility of amino acid of rapeseed and soybean meals in growing roilers. *Poultry Science.* 71:1486-1492.
- Zuprizal. 2006. Nutrisi Unggas (PTN 634). Jurusan MNT. Fakultas Peternakan. UGM. Yogyakarta.

LAMPIRAN

1. Komposisi Media CCA (Ponadisa, 2009)

<i>Bacto Peptone</i>	= 5 g/L
<i>Meat Extract</i>	= 3 g/L
NaCl	= 5 g/L
* <i>Casein</i>	= 2,5 g/L
Ca(OH) ₂	= 0,15 g/L
CaCl ₂	= 0,15 g/L
<i>Bacto Agar</i>	= 13,5 g/L
*Casein dapat diganti dengan <i>skim milk</i>	

2. Komposisi Media CCB (Pronadisa, 2009)

<i>Bacto Peptone</i>	= 5 g/L
<i>Meat Extract</i>	= 3 g/L
NaCl	= 5 g/L
<i>Casein</i>	= 2,5 g/L
Ca(OH) ₂	= 0,15 g/L
CaCl ₂	= 0,15 g/L

3. Komposisi Media Cair Bekatul (Saxena & Singh, 2011)

Bekatul	= 2 %
Glukosa	= 1 %
MgSO ₄	= 0,01 %
CaCl ₂	= 0,01 %
K ₂ HPO ₄	= 0,05 %

4. Komposisi Reagen Uji Aktivitas Enzim Protease

- Substrat casein dua persen dalam buffer phosphate pH 7
- Buffer phosphate pH 7
- 0,4 M Trichloro acetic acid (TCA)
- Tris HCl
- Akuades steril

5. Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Kurva baku tirosin didapatkan dengan cara disiapkan larutan stok dengan cara 1 g/mL *L-tyrosine* diencerkan dalam akuades dan dipanaskan hingga tirosin larut, namun tidak sampai mendidih. Larutan

stok tirosin dibiarkan hingga dingin pada suhu ruang. Kurva baku tirosin dibuat pada berbagai konsentrasi (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/ml). Masing-masing larutan tirosin diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 275 nm (Cupp-Enyard, 2008).

LT1. Karakter Morfologi Koloni Bakteri Proteolitik Asal Ampas Tahu

Isolat Karakter	TP5K1	TP6K4	TP6K5	TP6K8	TP6K9
Bentuk keseluruhan:					
Bulat	+	-	-	-	+
Tidak teratur	-	+	+	+	-
Konfigurasi:					
Menyeluruh	+	-	-	-	+
Beralur	-	+	-	-	-
<i>Lobate</i>	-	-	+	-	-
<i>Erose</i>	-	-	-	+	-
Margin:					
<i>Wavy</i>	-	+	-	-	-
<i>Smooth</i>	+	-	-	-	+
<i>Wooly</i>	-	-	-	+	-
<i>Lobate</i>	-	-	+	-	-
Elevasi:					
<i>Raised</i>	+	-	-	-	-
<i>Flat</i>	-	-	+	+	-
<i>Umbonate</i>	-	+	-	-	-
<i>Convex</i>	-	-	-	-	+
Konsistensi:					
Seperti mentega	+	+	+	+	+
Ciri optik					
Berkilat	+	+	+	+	+
Pigmentasi					
Kuning	+	-	+	-	-
Krem	-	+	-	+	+
Diameter koloni (mm)	3,5	11	57	1,5	4

LT2. Hasil Analisis Proksimat Bekatul

Parameter	Konsentrasi (%)
Protein	6,32
Lemak	7,23
Karbohidrat	61,00
Abu	14,82
Air	10,63

LT3. Perbandingan Luas Zona Bening (mm²) Isolat Bakteri Proteolitik Ampas Tahu

Isolat	Luas Zona Bening (mm ²)
TP5K1	9,05 ± 2,10 (b)
TP6K4	0,26 ± 0,04 (a)
TP6K5	19,20 ± 11,47 (b)
TP6K8	8,87 ± 0,82 (b)
TP6K9	11,54 ± 9,55 (b)

LT4. Perbandingan Aktivitas Protease (Unit/mL) Isolat TP5K1 dan TP6K5

Jam Ke-	Aktivitas Enzim (Unit/mL)	
	TP5K1	TP6K5
0	2.08±0.21 (a)	2.19±0.10 (a)
1	2.13±0.40 (a)	2.23±0.11 (a)
2	2.24±0.12 (a)	2.37±0.16 (a)
4	2.12±0.24 (a)	2.12±0.25 (a)
6	2.10±0.10 (a)	2.21±0.18 (a)
10	1.95±0.31 (a)	1.97±0.08 (a)
14	2.07±0.13 (a)	2.07±0.24 (a)
18	2.04±0.22 (a)	2.18±0.18 (a)
24	2.16±0.08 (a)	2.13±0.10 (a)
48	2.10±0.35 (a)	2.15±0.04 (a)

LT5. Uji Normalitas Luas Zona Bening (mm²) Isolat Bakteri Proteolitik Ampas Tahu

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Perlakuan	15	3.0000	1.46385	1.00	5.00
Ulangan	15	2.0000	.84515	1.00	3.00
Luas_Zona_Bening	15	9.7787	8.48062	.21	32.05

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Perlakuan	Ulangan	Luas_Zona_Bening
N		15	15	15
Normal Parameters ^a	Mean	3.0000	2.0000	9.7787
	Std. Deviation	1.46385	.84515	8.48062
Most Extreme Differences	Absolute	.153	.215	.233
	Positive	.153	.215	.233
	Negative	-.153	-.215	-.130
Kolmogorov-Smirnov Z		.592	.833	.901
Asymp. Sig. (2-tailed)		.875	.492	.392

a. Test distribution is Normal.

LT6. Uji Homogenitas Data Luas Zona Bening (mm²) Bakteri Proteolitik Terpilih

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ulangan	Between Groups	.000	4	.000	.000	1.000
	Within Groups	10.000	10	1.000		
	Total	10.000	14			
Luas_Zona_Bening	Between Groups	550.941	4	137.735	3.021	.071
	Within Groups	455.952	10	45.595		
	Total	1006.893	14			

Robust Tests of Equality of Means

		Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Ulangan	Brown-Forsythe	.000	4	10.000	1.000
Luas_Zona_Bening	Brown-Forsythe	3.021	4	4.049	.153

a. Asymptotically F distributed.

LT7. Perbedaan Luas Zona Bening (mm²) Isolat Bakteri Proteolitik Terpilih ($\alpha=0,05$)

Luas_Zona_Bening

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a			
TP6K4	3	.2600	
TP6K8	3	8.8733	8.8733
TP5K1	3	9.0533	9.0533
TP6K9	3	11.5100	11.5100
TP6K5	3		19.1967
Sig.		.315	.389

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

LT8. Uji Normalitas Aktivitas Enzim (Unit/mL) dan Jumlah Sel (Log 10 Sel/mL) Isolat Bakteri Proteolitik Terpilih

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Aktivitas_Enzim	60	2.1307	.19070	1.70	2.54
Jumlah_Sel	60	7.8200	.37553	6.74	8.41

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Aktivitas_Enzim	Jumlah_Sel
N		60	60
Normal Parameters ^a	Mean	2.1307	7.8200
	Std. Deviation	.19070	.37553
Most Extreme Differences	Absolute	.136	.067
	Positive	.079	.058
	Negative	-.136	-.067
Kolmogorov-Smirnov Z		1.055	.522
Asymp. Sig. (2-tailed)		.216	.948

a. Test distribution is Normal.

LT9. Uji Homogenitas Aktivitas Protease (Unit/mL) Isolat Bakteri Proteolitik Terpilih

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Aktivitas_Enzim	2.318	19	40	.013
Jumlah_Sel	1.169	19	40	.328

ANOVA

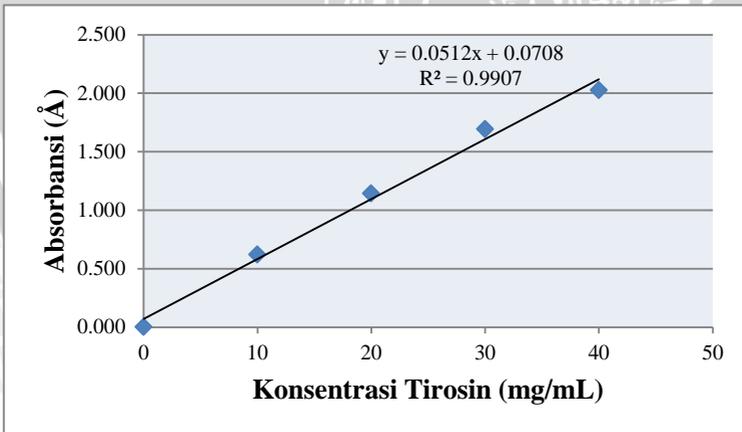
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Aktivitas_Enzim	Between Groups	.502	19	.026	.644	.848
	Within Groups	1.643	40	.041		
	Total	2.146	59			
Jumlah_Sel	Between Groups	4.812	19	.253	2.888	.002
	Within Groups	3.508	40	.088		
	Total	8.320	59			

Robust Tests of Equality of Means

		Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Aktivitas_Enzim	Brown-Forsythe	.644	19	20.116	.829
Jumlah_Sel	Brown-Forsythe	2.888	19	25.075	.007

a. Asymptotically F distributed.

LG1. Kurva Baku Tirosin



LG2. Kerangka Operasional

