

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE  
DARI LIMBAH SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (*Clarias* sp.)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**KARTIKA DYAH ANINTA  
NIM. 155080301111032**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE  
DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (*Clarias* sp.)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**KARTIKA DYAH ANINTA  
NIM. 155080301111032**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE  
DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (*Clarias* sp.)**

**SKRIPSI**

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

Oleh:

**KARTIKA DYAH ANINTA  
NIM. 155080301111032**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

SKRIPSI

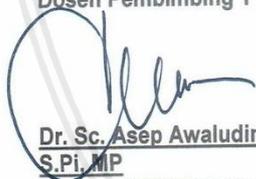
ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE  
DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (*Clarias sp.*)

Oleh:

KARTIKA DYAH ANINTA  
NIM. 155080301111032

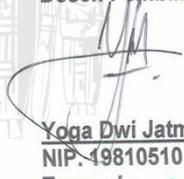
Telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 05 Desember 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing 1



Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto,  
S.Pi, MP  
NIP.19810602 200604 1 001  
Tanggal : 16 DEC 2019

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing 2



Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc. Ph.D.  
NIP. 19810510 200501 1 002  
Tanggal : 16 DEC 2019



Mengetahui  
Ketua Jurusan MSP  
Dr. Ir. Muhammad Firdaus, MP  
NIP. 19680919 200501 1 001  
Tanggal : 16 DEC 2019

**LEMBAR IDENTITAS PENGUJI**

Judul : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM  
PROTEASE DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN LELE (*Clarias*  
sp.)**

Nama Mahasiswa : KARTIKA DYAH ANINTA

NIM : 155080301111032

Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

**PENGUJI PEMBIMBING**

Pembimbing 1 : Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP.

Pembimbing 2 : Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc., Ph.D

**PENGUJI BUKAN PEMBIMBING**

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. Anies Chamidah, MP

Dosen Penguji 2 : Mikchaell Alfanov P.P, S.Pi., MP

Tanggal Ujian : 05 Desember 2019

## PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis benar hasil karya saya sendiri dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini yang disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 05 Desember 2019

Mahasiswa,

Kartika Dyah Aninta



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT atas karunia dan kesehatan yang diberikan selama ini sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Kedua orang tuaku tercinta atas segala kasih sayang yang telah diberikan, doa yang terus dipanjatkan, serta tak henti-hentinya memberikan nasihat, semangat dan motivasi kepada penulis.
3. Kakak dan adikku, Rizky Bagus Ananta dan Kamilia Dyah Primarani yang selalu memberikan semangat dan tempat untuk berbagi keluh kesah serta canda tawa.
4. Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP selaku Pembimbing 1 dan Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc. Ph.D. selaku Pembimbing II atas semua ilmu, bantuan, bimbingan, nasihat, saran, dan pengarahan, baik selama perkuliahan maupun dalam penyusunan skripsi.
5. Sahabat-sahabatku Linda, Fira, Husna, Rahma, Intan, Nia yang telah menjadi partner terbaik dalam segala situasi yang dialami penulis selama perkuliahan, penelitian sampai penyusunan skripsi.
6. Teman-teman bimbingan saya Soffi, Arwin, Fitri, Ainun, Hesti, Marisa, Rendhy, Achsanil dan Bayu atas bantuan, kebersamaan dan kerjasamanya selama penelitian dan proses penyusunan skripsi.
7. Teman-teman THP 2015 yang tak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan semangat, dukungan, bantuan, kritik dan saran.

Penulis menyadari laporan ini jauh dari kesempurnaan. Semoga laporan ini bisa bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 05 Desember 2019

Penulis

## RINGKASAN

**KARTIKA DYAH ANINTA.** Skripsi tentang Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Dari Saluran Pencernaan Ikan Lele (*Clarias* sp.) (di bawah bimbingan **Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP** dan **Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc. Ph.D.**).

Kebutuhan enzim protease dalam negeri semakin meningkat mengingat kegunaannya dalam berbagai bidang terutama dalam bidang industri. Protease merupakan enzim proteolitik yang mampu mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Enzim ini dapat diisolasi salah satunya dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias* sp.) mengingat saluran pencernaan erat kaitannya dengan enzim proteolitik dan merupakan salah satu tempat berkembangnya bakteri proteolitik. Untuk meningkatkan nilai guna limbah tersebut dan mengeksplorasi potensi bakteri penghasil enzim proteolitik.

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan dan Laboratorium Perekayasa Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan bulan Juni – Agustus 2019. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat dan mengetahui karakteristik bakteri penghasil enzim ekstraseluler dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias* sp.) serta mengetahui aktivitas protease dari media pertumbuhan berbeda.

Metode penelitian menggunakan metode eksperimen dan deskriptif. Sampel ikan lele (*Clarias* sp.) diambil dari pasar Dinoyo, Kota Malang. Langkah pertama penelitian ini adalah isolasi dan *screening* bakteri, uji kualitatif yang meliputi uji aktivitas enzim protease dan kadar protein, uji kuantitatif yang meliputi uji aktivitas spesifik serta identifikasi isolat terpilih. Data uji tersebut dianalisis dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) 16. dengan uji Duncan sebagai uji lanjut.

Isolat terpilih berdasarkan Indeks Proteolitik terbesar. Isolat S1 menunjukkan Indeks Proteolitik terbaik sebesar 2,26 mm diantara 18 isolat lain yang secara kualitatif menunjukkan aktivitas proteolitiknya pada media SMA (*Skim Milk Agar*). Berdasarkan uji kualitatif isolat S1 menunjukkan aktivitas proteolitik terbaik pada media *Trypthon Soya Broth* sebesar 28,119 U/ml dengan kadar protein terbaik pada media *Trypthon Soya Broth* sebesar 1,172 mg/ml dan kadar aktivitas spesifik pada media *Luria Bertani Broth* mencapai 36,479 U/mg. Saran yang dapat saya berikan adalah pada pembuatan inokulum lebih diperhatikan saat pengambilan bakteri, sehingga tingkat bakteri yang mati saat diisolasi dapat diminimalisir serta pada saat penyimpanan isolat lebih diperhatikan kerapatan tutupnya agar tidak terkontaminasi dari luar.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT, atas rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini. Dalam penyusunan laporan ini, tidak sedikit hambatan yang saya hadapi. Namun saya menyadari bahwa kelancaran dalam penyusunan tugas ini tidak lain berkat bantuan, dorongan, dan bimbingan dari pembimbing instansi serta kerjasama, sehingga kendala-kendala yang saya hadapi dapat teratasi.

Pada kesempatan ini penulis menyajikan laporan penelitian yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Dari Saluran Pencernaan Ikan Lele (*Clarias* sp.)” sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Di bawah bimbingan:

1. Dr. Sc. Asep Awaludin Prihanto, S.Pi, MP
2. Yoga Dwi Jatmiko, S.Si., M.App.Sc. Ph.D.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih belum sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan di kemudian hari. Penulis berharap semoga ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, terutama Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya di bidang Teknologi Hasil Perikanan. Aamiin.

Malang, 05 Desember 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>LEMBAR IDENTITAS PENGUJI.....</b>	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI .....</b>	<b>vi</b>
<b>UCAPAN TERIMA KASIH .....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>15</b>
1.1 Latar Belakang .....	15
1.2 Rumusan Masalah .....	17
1.3 Tujuan .....	17
1.4 Hipotesis .....	17
1.5 Kegunaan Penelitian .....	17
1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	18
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>19</b>
2.1 Ikan Lele .....	19
2.2 Enzim .....	22
2.3 Protease.....	25
2.4 Bakteri Proteolitik .....	30
2.5 Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim.....	32
2.5.1 Suhu .....	32
2.5.2 pH.....	33
2.6 Media Pertumbuhan .....	34
2.6.1 <i>Luria Bertani</i> .....	34
2.6.2 <i>Nutrient Broth</i> .....	35
2.6.3 <i>Tryptone Soya Broth</i> .....	35
2.6.4 <i>Skim Milk</i> .....	36
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>38</b>
3.1 Materi Penelitian .....	38
3.1.1 Alat Penelitian.....	38
3.1.2 Bahan Penelitian.....	38
3.2 Metode Penelitian.....	39
3.3 Rancangan Eksperimen .....	40
3.4 Prosedur Penelitian .....	41
3.4.1 Penelitian I.....	41
3.4.2 Penelitian II (Uji Efek Media terhadap Produksi Enzim) .....	45
3.5 Analisis Data .....	47
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>49</b>
4.1 Penelitian I (Isolasi dan <i>Screening</i> Bakteri Proteolitik).....	49
4.1.1 Penentuan Isolat Terbaik .....	49
4.1.2 Identifikasi Spesies berdasarkan Karakter Fenotip .....	52
4.2 Penelitian II (Efek Media Terhadap Produksi Protease).....	55



4.2.1 Hasil Uji Kualitatif Isolat Terpilih .....	55
4.2.2 Hasil Uji Kuantitatif Isolat Terpilih.....	57
<b>5. PENUTUP .....</b>	<b>63</b>
5.1 Kesimpulan .....	63
5.2 Saran .....	63
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>64</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>69</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Jenis Bakteri yang Tumbuh Pada Media <i>Luria Bertani</i> .....	34
2. Jenis Bakteri yang Dapat Tumbuh Pada Media <i>Nutrient Broth</i> .....	35
3. Jenis Bakteri yang Dapat Tumbuh Pada Media <i>Tryptic Soy</i> .....	36
4. Jenis Bakteri yang Dapat Tumbuh Pada Media <i>Skim Milk</i> .....	37
5. Rancangan Percobaan .....	40
6. Pengamatan Zona Bening Jam ke 24 .....	50
7. Karakteristik Morfologi Isolat.....	52
8. Uji <i>Microbatch</i> .....	52
9. Uji Kuantitatif Isolat 1 .....	52



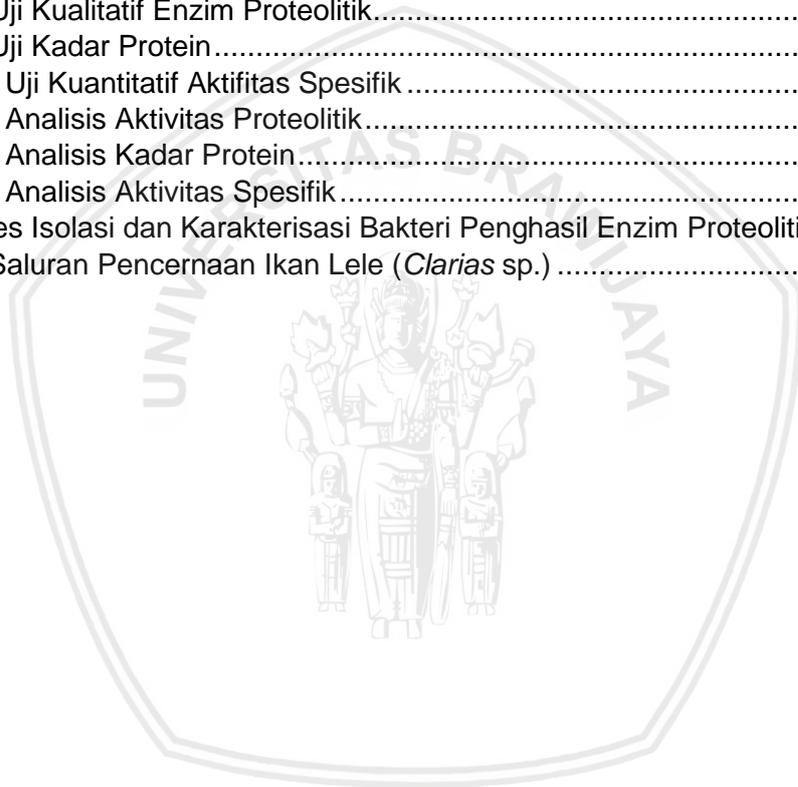
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Ikan Lele ( <i>Clarias</i> sp.).....	19
2. <i>Lock and Key</i> .....	23
3. <i>Induced Fit</i> .....	24
4. Klasifikasi Enzim Protease.....	27
5. Koloni Penghasil Zona Bening.....	49
6. Isolat Murni Bakteri 1.....	51
7. Pewarnaan Gram.....	53
8. Hasil Uji Kualitatif Aktivitas Proteolitik.....	56
9. Grafik Indeks Proteolitik Isolat Terpilih.....	56



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan <i>Skim Milk Agar</i> .....	69
2. <i>Screening</i> dan Isolasi Bakteri.....	70
3. Pembuatan <i>Luria Bertani Agar</i> .....	71
4. Pembuatan Media Kultur .....	72
5. Pembuatan KPB 1 M .....	74
6. Dialisis .....	75
7. Hasil Analisis Indeks Proteolitik .....	76
8. Hasil Uji Kualitatif Enzim Proteolitik.....	77
9. Hasil Uji Kadar Protein.....	78
10. Hasil Uji Kuantitatif Aktifitas Spesifik .....	79
11. Hasil Analisis Aktivitas Proteolitik.....	80
12. Hasil Analisis Kadar Protein.....	81
13. Hasil Analisis Aktivitas Spesifik.....	82
14. Proses Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Proteolitik dari Limbah Saluran Pencernaan Ikan Lele ( <i>Clarias</i> sp.) .....	83



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Enzim ini merupakan salah satu enzim dengan tingkat penjualan hingga 60% dari total penjualan enzim di dunia. Kebutuhan protease di Indonesia hampir 100% berasal dari impor (Baehaki dan Rinto, 2012). Aplikasi enzim protease misalnya pada industri pembuatan detergen, industri penyamakan kulit, bahan aditif pada industri pangan, dan zat terapeutik pada bidang farmasi (Gupta *et al.*, 2002).

Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dapat dihasilkan oleh tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease terbatas oleh tersedianya lahan tanam dan kondisi pertumbuhan yang sesuai, serta memerlukan waktu produksi enzim yang lama. Produksi protease dari hewan juga dibatasi oleh ketersediaan ternak penghasil enzim (Poernomo *et al.*, 2017). Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling potensial dibandingkan tanaman dan hewan. Penggunaan mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik (Yempita *et al.*, 2017). Koloni yang membentuk zona jernih pada media selektif merupakan penghasil protease dan digunakan untuk penelitian selanjutnya meliputi identifikasi isolat bakteri, penentuan kurva produksi, ekstraksi, fraksinasi, dan karakterisasi enzim protease (Zusfahair *et al.*, 2011). Beberapa genus bakteri yang diketahui mampu menghasilkan protease adalah *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, dan *Pseudomonas* (Yempita *et al.*, 2017).

Enzim proteolitik semula dikenal karena kaitannya dengan proses pencernaan. Pada penelitian terdahulu, isolasi enzim proteolitik saluran pencernaan ikan sudah dilakukan pada beberapa spesies. Di dalam tubuh ikan, bakteri penghasil enzim proteolitik umumnya hidup di dalam jaringan ikan termasuk saluran pencernaan yang berfungsi meningkatkan kemampuan ikan mencerna protein, sehingga buangan protein atau nitrogen melalui feses akan berkurang (Rahmawan *et al.*, 2014). Bakteri proteolitik umum ditemui pada usus lele yang merupakan salah satu adaptasi lele dalam mencerna substansi kompleks berupa protein dalam waktu yang singkat (Kurniasih *et al.*, 2013).

Bakteri penghasil enzim protease disebut bakteri proteolitik. Bakteri yang terdapat pada saluran pencernaan ikan diantaranya adalah *Citrobacter* sp., dan *Bacillus* sp. (Artika, 2010). Bakteri penghasil enzim ekstraseluler ini dapat diperoleh dari saluran pencernaan (lambung, hepatopankreas dan usus) dan dari sedimen tambak budidaya (Kurniawati, 2015). Di dalam saluran pencernaan terdapat enzim protease dan enzim pencernaan lain yang mengkatalisis pemecahan nutrient kompleks (protein, karbohidrat, dan lemak) menjadi nutrient sederhana. Adanya kelenjar pencernaan yang mampu menghasilkan enzim-enzim pencernaan, kemudian akan disekresikan ke dalam saluran pencernaan (intestine). Aktivitas enzim pencernaan berkorelasi dengan jumlah enzim yang terdapat pada tempat pencernaan berlangsung. Hal ini dapat diartikan bahwa bakteri yang berpotensi menghasilkan enzim protease dapat diisolasi dari tempat pencernaan berlangsung (kelenjar penghasil maupun saluran pencernaan) (Al Gadri *et al.*, 2014). Selama ini limbah saluran pencernaan belum dimanfaatkan secara optimum. Salah satu alternatif pemanfaatan limbah tersebut adalah sebagai sumber mikroorganisme penghasil protease. Hal ini karena limbah tersebut mengandung nutrien yang berpotensi sebagai medium pertumbuhan mikroorganisme penghasil protease (Zusfahair *et al.*, 2011).

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah bakteri yang berpotensi untuk menghasilkan protease dapat diisolasi dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp.*)?
2. Apakah media pertumbuhan memengaruhi produksi enzim protease?

## 1.3 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini secara khusus adalah:

1. Untuk memperoleh isolat bakteri yang berpotensi menghasilkan protease dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp.*),
2. Untuk mengetahui aktivitas protease dari isolat terpilih pada media berbeda.

## 1.4 Hipotesis

Hipotesis yang dapat dilakukan adalah:

$H_0$  : Tidak terdapat bakteri penghasil enzim protease di saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp.*) dan tidak ada aktivitas protease yang dihasilkan.

$H_1$  : Terdapat bakteri penghasil enzim protease di saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp.*) dan ada aktivitas protease yang dihasilkan.

## 1.5 Kegunaan Penelitian

Laporan ini diharapkan dapat memberikan manfaat dan informasi yang berguna bagi masyarakat, mahasiswa, lembaga keilmuan maupun perguruan tinggi tentang karakteristik isolat mikroba proteolitik hasil isolasi dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp.*) dan mengetahui aktivitas enzim protease yang dihasilkan.

### 1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – Agustus 2019. Penelitian ini bertempat di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan dan Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya Malang. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Lele

Ikan lele merupakan salah satu komoditas budidaya yang memiliki berbagai kelebihan. Peningkatan produksi ikan lele yang mencapai 62.807 ton di tahun 2012, kemudian menjadi 79.927,5 ton di tahun 2013 dan terus melonjak mencapai 98.830,1 ton ditahun 2014 di Jawa timur dengan melibatkan hampir 46 ribu orang pembudidaya (Kusumawardani *et al.*, 2018).

Klasifikasi ikan lele menurut Hadiroseyani *et al.* (2006) adalah:

Kingdom : *Animalia*  
Filum : *Vertebrata*  
Kelas : *Pisces*  
Sub kelas : *Teleostei*  
Ordo : *Ostariophysoidei*  
Famili : *Clariidae*  
Genus : *Clarias*



**Gambar 1.** Ikan Lele (*Clarias* sp.) (Google Image, 2019)

Ikan lele merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang potensial untuk dibudidayakan guna memenuhi gizi masyarakat (Su'udi *et al.*, 2011). Tubuh ikan

lele tidak bersisik, memiliki mulut yang relatif lebar yaitu  $\frac{1}{4}$  dari panjang total tubuhnya dan berlendir. Ikan lele memiliki empat pasang dan sungut yang terletak di sekitar mulutnya (Azizati *et al.*, 2015). Ikan lele memiliki kemampuan beradaptasi yang tinggi terhadap lingkungan. Maka dari itu, ikan lele tidak memerlukan persyaratan atau kondisi perairan yang khusus seperti ikan tawar lainnya (ikan bersisik) (Yuarni *et al.*, 2015).

Ikan lele merupakan sejenis ikan yang hidup di air tawar dan mudah dikenali karena tubuhnya yang licin, agak pipih memanjang, serta memiliki "kumis" panjang yang mencuat dari sekitar bagian mulutnya (Sitio *et al.*, 2017). Dalam budidaya, ikan ini memiliki kelebihan yaitu panen yang cepat, hasil produksi yang lebih tinggi, lebih tahan terhadap penyakit, mampu bertahan hidup di perairan yang airnya mengandung sedikit oksigen, dan teknik pemeliharaannya yang sederhana sehingga ikan lele banyak digemari oleh masyarakat luas (Manullang *et al.*, 2018).

Ikan lele termasuk ikan omnivora, juga cenderung bersifat karnivora. Di alam bebas, makanan alami ikan lele terdiri fitoplankton dari jenis alga dan zooplankton yang berupa jasad-jasad renik seperti kutu air, cacing rambut, rotifera, jentik-jentik nyamuk, ikan kecil, siput-siput kecil serta sisa bahan organik yang masih segar. Lele yang dipelihara di kolam memakan sisa-sisa makanan yang membusuk yang berasal dari limbah rumah tangga atau limbah dapur, saat dibudidayakan, lele diberi pakan buatan seperti pelet (Akbar, 2014).

- Saluran Pencernaan

Saluran pencernaan ikan berturut-turut di mulai dari mulut, rongga mulut, faring, esophagus, lambung, usus dan anus. Struktur histologi esophagus, lambung dan usus ikan secara umum tersusun atas empat lapisan utama yaitu mukosa, submucosa, muskularis dan serosa. Lapisan mukosa terdiri dari lamina epithelia, lamina propria dan muskularis mukosa. Lapisan submucosa terdiri dari

jaringan ikan padat tidak teratur, pembuluh darah, limfe dan saraf (Nafis *et al.*, 2017).

Menurut Al Gadri *et al.*, (2014) enzim-enzim pencernaan dihasilkan oleh hepatopankreas dan disekresikan ke usus (intestine). Hepatopankreas merupakan kelenjar yang berfungsi mensekresikan enzim yang baru disintesis (zymogen), sedangkan intestine merupakan tempat disekresikannya protease yang telah teraktivasi. Hal tersebut mengakibatkan aktivitas protease yang dihasilkan berbeda, namun dapat diartikan bahwa kedua tempat tersebut memiliki bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease.

Saluran pencernaan merupakan salah satu sumber protease. Pada penelitian terdahulu, enzim protease banyak diisolasi dari saluran pencernaan. Beberapa diantaranya adalah isolasi enzim protease dari saluran pencernaan ayam kampung (Sumardi dan Lengkana, 2009), ikan kembung (*Restrelliger sp.*) (Hasan *et al.*, 2015), ikan tuna (Suptijah, 1998), ikan gurami (*Osphronemus gouramy Lac.*), ikan sidat (*Anguilla bicolor McClelland*) (Susilo *et al.*, 2013), ikan nilam (*Osteochillus hasselti*) (Al Gadri *et al.*, 2014), dan ikan kerapu macam (Yamin *et al.*, 2008).

Aktivitas protease pada saluran pencernaan dipengaruhi oleh jumlah protease aktif yang terdapat di dalam saluran pencernaan, jumlah pakan dan kualitas pakan serta pola makan bukan oleh ukuran besar kecilnya ukuran ikan. Tingginya aktivitas protease dipengaruhi oleh spesies, jenis (karnivora, omnivora, herbivora) dan sampling dilakukan saat objek dalam fase pertumbuhan atau tidak (Taufik *et al.*, 2017). Tingginya aktivitas protease pada saluran pencernaan juga dipengaruhi oleh waktu pengambilan sampling (Yamin *et al.*, 2008).

## 2.2 Enzim

Enzim adalah katalisator biologis dalam reaksi kimia yang sangat dibutuhkan dalam kehidupan. Semua enzim adalah protein dan sama seperti protein lain mempunyai berat molekul berkisar dari kira-kira 12.000 sampai 1 juta. Oleh karena itu enzim berukuran amat besar dibandingkan dengan substrat atau gugus fungsional targetnya. Enzim disintesis dalam sel dan dikeluarkan dari sel yang membentuknya melalui proses eksositosis. Enzim yang disekresikan ke luar sel digunakan untuk pencernaan di luar sel atau disebut "*extra cellular digestion*", sedangkan enzim yang dipertahankan dalam sel digunakan untuk pencernaan dalam sel itu sendiri atau disebut "*intra celuller digestion*". Enzim pencernaan yang disekresikan dalam rongga pencernaan berasal dari sel-sel mukosa lambung, pilorik kaeka, pankreas dan mukosa usus (Fitriliyani, 2011).

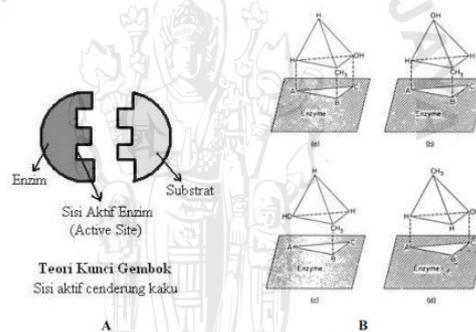
Enzim adalah katalis atau agen kimia yang mempercepat reaksi kimia tanpa menjadi dikonsumsi oleh reaksi. Kebanyakan enzim adalah protein yang berfungsi mengurangi energi aktivasi dalam reaksi kimia. Enzim bekerja pada reaktan disebut substrat; enzim menempel pada substrat dan kemudian enzim mengubah substrat menjadi produk sementara enzim tetap tidak terpengaruh. Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Suhu adalah salah satu faktor lingkungan dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Faktor lain yang mempengaruhi enzim adalah pH (Eed, 2013).

Enzim mengkatalis reaksi tanpa mengalami perubahan permanen selama proses katalis, sehingga enzim yang telah menghasilkan produk akan bereaksi kembali dengan substrat menghasilkan produk secara berulang-ulang hingga reaksi selesai. Enzim bekerja dengan baik pada kisaran pH sel makhluk hidup (antara 5-8 umumnya sekitar netral) dan pada suhu sel antara 20-40oC. Kecepatan reaksi enzim juga bisa dipercepat dengan faktor berkisar antara  $10^8$ -

10<sup>11</sup> bila dibandingkan dengan reaksi tanpa melibatkan enzim. Reaksi enzimatik berlangsung dengan sangat efisien (Sutrisno, 2017).

Menurut Winarno (2010), mekanisme reaksi enzimatik digambarkan dengan 2 metode, diantaranya adalah:

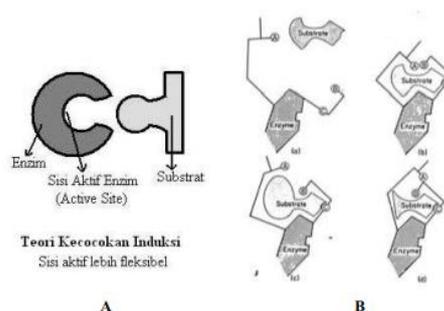
1. Model Gembok dan Kunci: Terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim karena adanya kesesuaian bentuk ruang antara substrat dengan sisi aktif (*active site*) dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, yang berperan sebagai gembok, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula.



Gambar 19. A. Gambaran teori *lock and key*. B. Model *lock and key* pada proses ikatan enzim alkohol dehidrogenase dengan substrat etanol.

**Gambar 2.** *Lock and Key* (Susanti dan Fibrina, 2017)

2. Model Ketetapan Induksi: Teori induksi enzim, menekankan enzim melakukan penyesuaian bentuk untuk berikatan dengan substrat. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan kecocokan dengan substrat dan membuat ikatan enzim substrat lebih reaktif. Molekul enzim memiliki sisi aktif tempat melekatnya substrat dan terbentuk molekul kompleks enzim-substrat. Pengikatan substrat oleh enzim yang sesuai dapat mendorong terbentuknya molekul kompleks enzim-substrat.



Gambar 20. A. Teori *induced fit*, B. Perubahan konformasi sisi aktif enzim supaya substrat dapat berikatan sempurna dengan enzim.

### Gambar 3. *Induced Fit* (Susanti dan Fibrina, 2017)

Berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan dalam 2 golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim (enzim intraseluler), dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan dari sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya. Keberadaan enzim di dalam sel maupun di luar sel mempengaruhi proses pemanenan enzim tersebut (Kasipah *et al.*, 2013).

Pemurnian enzim adalah salah satu cara untuk memisahkan protein enzim dari protein jenis lain dan kontaminan. Jika enzim berada di dalam sel, maka disrupti atau penghancuran sel perlu dilakukan untuk memperoleh enzim, sedangkan jika enzim berada di luar sel, maka dapat dilakukan ekstraksi dan purifikasi enzim dari medium secara langsung (Susanti dan Fibrina, 2017).

Prinsip dasar pemurnian adalah melakukan ekstraksi, dilanjutkan dengan isolasi/memisahkan enzim yang dikehendaki dari komponen sel yang lain seperti karbohidrat, protein lain, asam nukleat dan molekul kecil lain. Proses pemurnian dapat dilakukan dengan memanfaatkan sifat-sifat enzim yaitu berdasarkan muatan, ukuran, kelarutan dan afinitas. Hal yang harus diperhatikan adalah

terjadinya inaktivasi enzim yang disebabkan oleh panas, proteolisis, pH yang tidak sesuai, oksidasi, agen pendenaturasi, inhibitor, hilangnya kofaktor. Biasanya pemurnian dilakukan pada suhu rendah 4°C. Pada proses dialisis, molekul yang lebih kecil akan keluar melalui pori-pori kantung dialisis, sedangkan molekul yang besar akan tetap berada didalam kantung (Sutrisno, 2017).

Molekul dengan berat molekul lebih kecil dari 20.000 Dalton dapat melalui membran, sedangkan yang berat molekulnya lebih besar akan tertahan di dalam membran. Jika membran berisi larutan protein atau enzim dimasukkan dalam larutan buffer, maka molekul kecil dalam larutan protein atau enzim akan keluar dari pori-pori membran seperti garam anorganik dan molekul protein atau enzim yang berukuran besar tetap dalam membran. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion tidak seimbang di dalam dan di luar membran. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar membran. Molekul yang lebih kecil akan terus terdifusi keluar membran hingga ion-ion dalam membran seimbang atau dapat diabaikan (Baehaki *et al.*, 2011).

### 2.3 Protease

Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme (Yuniati *et al.*, 2015). Protease dapat dihasilkan oleh tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Beberapa genus bakteri yang diketahui mampu menghasilkan protease adalah *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, dan *Pseudomonas* (Yempita *et al.*, 2017).

Enzim proteolitik semula dikenal karena kaitannya dengan proses pencernaan. Di dalam tubuh ikan, bakteri penghasil enzim proteolitik umumnya hidup di dalam jaringan ikan termasuk saluran pencernaan. *Citrobacter* sp. dan

*Bacillus* sp. merupakan bakteri yang diketahui terdapat pada saluran pencernaan ikan (Artika, 2010). Enzim proteolitik (protease) banyak diaplikasikan dalam industri pangan maupun nonpangan (Roosdiana *et al.*, 2002). Dalam industri pangan, protease digunakan antara lain untuk menjernihkan bir, mengempukkan daging, memperbaiki tekstur adonan roti dan lain-lain (Artika, 2010).

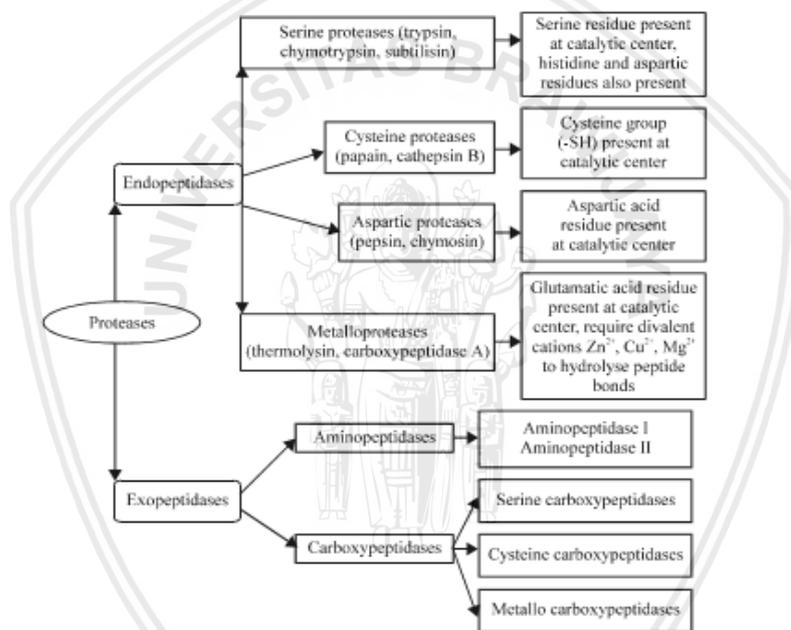
Enzim protease seperti serine protease (EC. 3.4.21), cysteine (thiol) protease (EC 3.4.22), aspartic proteases (EC 3.4.23) dan metalloprotease (EC 3.4.24) merupakan salah satu group dari enzim industri yang penting (Baehaki dan Rinto, 2012). Pada industri pengolahan ikan maupun pemanfaatan ikan oleh rumah tangga, bagian dari ikan yang terbuang dan menjadi limbah di antaranya adalah bagian kepala, ekor, sirip, tulang, dan jeroan sehingga menghasilkan limbah sebesar 65%. Apabila limbah ini tidak segera ditangani, maka tidak tertutup kemungkinan akan menyebabkan terjadinya pembusukan sehingga dapat menimbulkan pencemaran lingkungan (Manullang *et al.*, 2018).

Enzim protease dapat diekstrak dari limbah hasil perikanan, yaitu jeroan ikan-ikan besar yang berpotensi sebagai sumber enzim, sehingga dapat dikatakan penelitian ini sebagai upaya pemanfaatan limbah untuk peningkatan mutu produk (Suptijah, 1998). Protease dapat dihasilkan dari hewan (tripsin, pepsin), tumbuhan (papain, bromelin), dan mikroba. Beberapa protease asal mikroba antara lain *Serratia marcescens* NRRL B- 23112 asal tanah, *Bacillus* sp. dari kulit ikan kakap dan *Photorhabdus* sp. asal nematoda azorean (Roosdiana *et al.*, 2002).

Enzim protease merupakan enzim pemecah protein, yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polipeptida pada molekul protein (polipeptida) sehingga menghasilkan peptide dan asam amino. Isolasi dan kultivasi bakteri proteolitik dapat dilakukan dengan kultur pada media SMA. Susu skim pada media SMA mengandung protein susu kasein yang merupakan sumber nutrisi yang digunakan

bakteri proteolitik (Arifiani dan Stalis, 2018). Pada proses degradasi kasein oleh bakteri, diharapkan enzim protease ekstraseluler yang disekresi bakteri mampu menghasilkan zona bening di sekitar koloni (Kurniasih *et al.*, 2013).

Protease dapat diklasifikasikan atas dasar endoenzim dan eksoenzim yang sehubungan dengan kemampuan katalitik pada substrat protein. Untuk klasifikasi lebih lanjut, maka protease tersebut dibagi lagi atas protease serin, aspartat, sistein atau metaloprotease yang berdasarkan atas aktivitas katalitiknya. Klasifikasi protease dapat dilihat pada **Gambar 4**.



**Gambar 4.** Klasifikasi Enzim Protease (Kumar *et al.*, 2018)

Kelas utama enzim terbagi menjadi 6, yaitu oksidoreduktase (kelompok 1), transferase (kelompok 2), hidrolase (kelompok 3), liase (kelompok 4), isomerase (kelompok 5) dan ligase (kelompok 6) (Susanti dan Fibrina, 2017).

1. Oksidoreduktase mengkatalisis reaksi oksidasi dan reduksi, dan biasanya menggunakan koenzim NAD, NADP, FAD, Lipat atau Koenzim Q. Termasuk golongan enzim oksidoreduktase adalah dehidrogenase, oksidase, peroksidase, reduktase, hidroksilase dan oksigenase,

2. Transferase adalah enzim yang mengkatalisis pemindahan gugus tertentu seperti gugus 1-karbon, aldehid dan keton, asil, glikosil, fosfat atau gugus yang mengandung S. Termasuk dalam kelompok enzim transferase adalah enzim aminotransferase, asil karnitin transferase, transkarboksilase, transaldolase dan transketolase, glukokinase dan piruvat kinase,
3. Hidrolase adalah enzim yang mengkatalisis peningkatan pemecahan ikatan antara karbon dengan atom lainnya melalui penambahan molekul air. Termasuk kelompok enzim hidrolase adalah enzim esterase, amidase, peptidase, fosfatase, dan glikosidase,
4. Liase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan karbon-karbon, karbonsulfur, dan karbon-nitrogen. Termasuk kelompok enzim liase adalah enzim dekarboksilase, aldolase, sintase, hidrase atau dehidratase, deaminase, nukleotida siklase,
5. Isomerase adalah enzim yang mengkatalisis raseminasi optik atau isomer geometrik dan reaksi oksidasi reduksi intramolekuler tertentu. Termasuk kelompok enzim isomerase adalah enzim epimerase, rasemase, mutase dan isomerase,
6. Ligase adalah enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dengan karbon, karbon dengan sulfur, karbon dengan nitrogen, serta karbon dengan oksigen. Untuk membentuk ikatan tersebut diperlukan energi ATP. Termasuk kelompok enzim ligase adalah enzim sintetase dan karboksilase.

Protease adalah salah satu grup enzim paling penting dibidang industri. Penggunaan protease sebagai alternatif bahan kimia telah terbukti berhasil dalam meningkatkan kualitas kulit dan mengurangi pencemaran lingkungan diindustri kulit. Salah satu kegunaan utama protease adalah dalam industri makanan (Yuniati *et al.*, 2015). Protease digunakan untuk melunakkan protein daging, terutama kolagenase. Protease lain yang banyak digunakan adalah rennin, yang memecah protein susu dan menyebabkan mereka mengental, membentuk dasar

keju. Protease juga digunakan untuk untuk menjernihkan bir dan untuk memperbaiki tekstur adonan dalam pembuatan roti (emulsifier) (Sutrisno, 2017).

Selain itu, enzim proteolitik telah digunakan untuk waktu yang lama dalam berbagai bentuk terapi. Penggunaannya dalam aplikasi biomedis yang penting didasarkan pada beberapa studi klinis telah menunjukkan manfaat dalam onkologi, kondisi peradangan, kontrol reologi darah, dan regulasi kekebalan tubuh. Protease dari sumber mikroba lebih disukai di sektor industri dari pada enzim dari sumber tanaman dan hewan karena enzim dari mikroba memiliki hampir semua karakteristik yang diinginkan untuk aplikasi bioteknologi. Kebanyakan protease komersial diproduksi dari bakteri, terutama yang bersifat netral dan basa. Bakteri-bakteri tersebut termasuk ke dalam genus *Bacillus* diantaranya *B.macerans*, *B.licheniformis*, dan *B.subtilis*. *Bacillus* adalah produsen yang baik untuk menghasilkan protease ekstraseluler karena ketahanan mereka pada suhu tinggi dan rentang pH yang luas (Arfarita, 2015).

Penggunaan mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik (Yuniati *et al.*, 2015). Adapun penggunaan media cair memiliki beberapa keunggulan, yaitu proses sterilisasi mudah, kontrol proses fermentasi yang sederhana dan tidak memakan banyak tenaga, pertumbuhan mikroorganisme lebih cepat jika dengan agitasi dan aerasi yang cukup. Disamping itu, penggunaan media cair dalam proses fermentasi memudahkan proses pemanenan produk enzim (Susanti dan Fibrina 2017).

Pertumbuhan bakteri dalam suatu media cair dapat terlihat dalam berbagai bentuk, yaitu: 1). Kekeruhan yang biasanya terlihat pada seluruh bagian medium, 2). Pertumbuhan pada permukaan yang dapat berbentuk pelikel (pertumbuhan di atas bagian media cair), cincin (pertumbuhan berbentuk cincin pada permukaan

media cair), flokulen atau membran. 3). Sedimen atau endapan, yaitu kumpulan sel-sel yang mengumpul pada dasar tabung dan akan menyebar lagi jika tabung digerakkan atau dikocok. Medium pada bagian atas tabung mungkin akan tetap bening jika inkubasi dilakukan lebih lama (Yempita *et al.*, 2017).

Aktivitas protease dihitung (1) dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1  $\mu$ mol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat, di mana: (Yusriah dan Kuswytasari, 2013).

$$Ae = Vx/ba$$

Ae = aktivitas enzim (mg/mL menit)

x = konsentrasi tirosin (mg/mL)

V = volume total sampel tiap tabung (mL)

a = volume enzim (mL)

b = waktu reaksi (menit)

Aktivitas spesifik protease (U/mg) merupakan pembagian antara aktivitas protease (U/ml) dengan kadar protein (mg/ml) (Roosdiana *et al.*, 2002).

#### 2.4 Bakteri Proteolitik

Enzim proteolitik dapat dihasilkan dari bakteri penghasil proteolitik yang disebut bakteri proteolitik. Enzim ini juga dapat diproduksi dari tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Mikroorganisme merupakan sumber yang paling potensial untuk produksi enzim protease. Beberapa dari genus bakteri ini diketahui mampu menghasilkan protease adalah *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, dan *Pseudomonas* (Yempita *et al.*, 2017).

Mikroorganisme dapat berupa bakteri, fungi, protozoa dan lain-lain, terdapat di berbagai tempat seperti tanah, debu, air, udara kulit dan selaput lendir. Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dan metabolit sekunder yang dapat

mendegradasi bahan kompleks sehingga dapat dimanfaatkan dalam pengelolaan limbah. Contoh enzim hidrolitik yaitu protease, selulase, esterase, lipase, fosfatase, kutinase, dan amilase. Enzim protease dan lipase merupakan salah satu enzim yang penting untuk mendegradasi biomassa dan bahan organik (Arifiani dan Stalis, 2018).

Genus *Bacillus* termasuk batang besar, gram positif, aerob yang membentuk rantai. Kebanyakan anggota genus ini adalah organisme saprofit dan beberapa menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat memecah polisakarida, asam-asam nukleat, dan lemak, serta menggunakannya sebagai sumber karbon dan energi. Kemampuannya dalam menguraikan bahan-bahan organik menyebabkan genus *Bacillus* berperan penting dalam proses dekomposisi bahan (Kurniasih *et al.*, 2013). *Bacillus* sp. termasuk bakteri gram positif, yakni katalase positif yang umum ditemukan di tanah, air, udara dan materi tumbuhan yang terdekomposisi (debu). *Bacillus* sp. bersifat aerob dan anaerob obligat serta bakteri ini mampu membentuk endospora ketika kondisi lingkungan yang tertekan. Spora ini dapat bertahan 60 tahun atau lebih pada kondisi lingkungan ekstrim (Sholihati *et al.*, 2013).

Unsur yang paling banyak dibutuhkan oleh mikroorganisme secara umum disebut dengan makroelemen yang mencakup karbon, oksigen, hydrogen, nitrogen, sulfur, fosfor, kalium, kalsium, magnesium dan besi. Enam komponen (C,O,H,N,S dan P) merupakan komponen pada karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat. Empat makro elemen ada dalam sel sebagai kation dan berperan pada berbagai fungsi. Sebagai contoh, Kalium (K) dibutuhkan untuk aktivitas sejumlah enzim termasuk dalam sintesis protein. Kalsium (Ca) berfungsi dalam ketahanan endospora bakteri terhadap panas. Magnesium (Mg) sebagai kofaktor dalam banyak enzim, kompleks dengan ATP dan stabilitas ribosom dan membran sel. Besi ( $Fe^{2+}$  dan  $Fe^{3+}$ ) adalah bagian dari cytochrom dan kofaktor untuk enzim

dan protein pembawa elektron. Sulfur (S) dibutuhkan dalam jumlah sedikit namun penting karena beberapa asam amino tersusun oleh adanya sulfur yaitu sistein dan metionin. Asam amino merupakan penyusun protein dan enzim. Natrium (Na) merupakan ion yang dibutuhkan organisme dalam kehidupannya. Pada penumbuhan organisme anaerob, penambahan natrium dalam bentuk sodium tioglikat dilakukan untuk mengikat oksigen sehingga terbentuk suasana anaerob. Pada *anaerobic jar* juga sering ditambahkan garam natrium seperti natrium bikarbonat dan natrium borohidrate yang akan melepaskan  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2$  untuk berikatan dengan  $\text{O}_2$  (Hidayat *et al.*, 2018).

## 2.5 Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Faktor – faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah sebagai berikut:

### 2.5.1 Suhu

Peningkatan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Hal ini disebabkan oleh suhu yang makin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk makin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim (Kosim dan Putra, 2010). Ketika suhu tinggi, laju aktivitas enzim tinggi karena substrat bertabrakan situs aktif pada enzim lebih sering ketika molekul bergerak cepat (Susanti dan Fibrina, 2017). Hal ini disebabkan karena enzim mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim.. Denaturasi menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada

bagian permukaannya sehingga sisi aktif enzim berubah dan mengakibatkan terjadinya penurunan aktivitas enzim (Baehaki *et al.*, 2011) .

### 2.5.2 pH

Mikroorganisme umumnya hidup di sekitar pH netral dan dikenal sebagai organisme neutrofil. Mikroorganisme yang hidup pada kondisi asam disebut dengan asidofil dan pada daerah basa disebut dengan basofil. Untuk menjaga agar pH dalam medium konstan, maka perlu ditambahkan zat-zat buffer misalnya  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Dalam campuran garam tersebut garam-garam dibasis akan mengabsorpsi ion-ion H, sedang garam-garam monobasis akan menyerap ion OH (Hidayat *et al.*, 2018).

Setiap enzim memiliki profil yang berbeda terkait dengan pH lingkungannya. Sebagian besar enzim aktif dalam kisaran pH 4.5-8 beberapa sangat aktif pada pH rendah. pH dimana suatu enzim menunjukkan aktivitas maksimum disebut pH optimum. Perubahan pH dapat menyebabkan pecahnya ikatan akan mengubah bentuk enzim termasuk aktivitasnya. pH yang ekstrim akan menyebabkan terjadinya denaturasi dan mengubah muatan pada residu asam amino yang penting untuk proses katalisis (Sutrisno, 2017).

### 2.5.3 Konsentrasi Substrat

Pertambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi apabila konsentrasi enzim tetap. Kompleks enzim substrat akan terbentuk apabila ada kontak antara enzim dengan substrat. Kontak ini terjadi pada suatu tempat atau bagian enzim yang disebut bagian aktif. Pada konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim ini hanya menampung sedikit substrat. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada bagian aktif tersebut. Konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar dan hal ini menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Pada keadaan bertambah

besarnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi kompleks enzim substrat, sehingga jumlah hasil reaksinya pun tidak bertambah besar (Wuryanti, 2004). Turunnya aktivitas enzim dengan penambahan NaCl dapat terjadi karena perubahan konformasi protein enzim akibat adanya ion Na<sup>+</sup> dan Cl<sup>-</sup> yang berikatan dengan gugus fungsional asam amino sehingga mengubah muatan listriknya. Hal ini dapat mempengaruhi struktur sisi aktif protein sehingga aktivitas enzim menjadi berubah. Aktivitas enzim berhubungan langsung dengan perubahan struktur tersier dari molekul protein enzim (Hasan *et al.*, 2015).

## 2.6 Media Pertumbuhan

### 2.6.1 *Luria Bertani*

*Luria bertani* digunakan dalam budidaya mikroorganisme yang mudah untuk beradaptasi dengan lingkungan dan mempunyai resisten hidup yang tinggi. Media ini kaya nutrisi untuk pertumbuhan biakan murni strain rekombinan. (Himedialab, 2015). *Luria bertani* merupakan media yang memiliki komposisi berupa *tryptone* 10 g, NaCl 10 g, dan *yeast extract* 5 g. Pembuatan media LB dapat dilakukan dengan melarutkan komposisi tersebut dalam 1 liter akuades dan disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121<sup>o</sup>C (Atlas, 2010). Adapun jenis bakteri yang dapat ditumbuhkan media *luria bertani* dapat dilihat pada **Tabel 1**.

**Tabel 1.** Jenis Bakteri yang Tumbuh Pada Media *Luria Bertani* (Himedialab, 2015)

Organism Cultural Response	Inoculum (CFU)	Growth
<i>Eschericia coli</i> ATCC 23724	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Eschericia coli</i> ATCC 25922	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Eschericia coli</i> DH5 alpha MTCC 1652	50-100	<i>luxuriant</i>

### 2.6.2 Nutrient Broth

*Nutrient broth* merupakan media kultur dasar yang digunakan dalam budidaya mikroorganisme umum. Media ini dapat disimpan pada suhu di bawah 10-30°C (Himedialab, 2018). *Nutrient broth* merupakan media yang memiliki komposisi berupa *peptone* 5 g, NaCl 5 g, *yeast extract* 2 g, dan *beef extract* 1 g. Pembuatan media NB dapat dilakukan dengan melarutkan komposisi tersebut dalam 1 liter akuades dan disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C (Atlas, 2010). Adapun jenis bakteri yang dapat ditumbuhkan media NB dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 2.** Jenis Bakteri yang Dapat Tumbuh Pada Media *Nutrient Broth* (Himedialab, 2018)

Organism	Inoculum (CFU)	Growth
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (00013 <sup>0</sup> )	50-100	Good-luxuriant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (00025 <sup>0</sup> )	50-100	Good-luxuriant
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (00034 <sup>0</sup> )	50-100	Good-luxuriant
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	50-100	Good-luxuriant

### 2.6.3 Tryptone Soya Broth

*Tryptone soy broth* merupakan media yang digunakan sebagai media umum pertumbuhan bakteri aerob dan jamur. Media ini adalah media yang sangat bergizi bagi berbagai organisme (Himedialab, 2011). *Tryptic soy broth* merupakan media yang memiliki komposisi berupa *pancreatic digest of casein* 18 g, *papaic digest of soybean meal* 6 g, dan NaCl 6 g. Pembuatan media TSB dapat dilakukan dengan melarutkan komposisi tersebut dalam 1 liter akuades dan disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C (Atlas, 2010). Adapun jenis bakteri yang dapat ditumbuhkan media *tryptic soy broth* dapat dilihat pada **Tabel 3**.

**Tabel 3.** Jenis Bakteri yang Dapat Tumbuh Pada Media *Tryptic Soy* (Himedialab, 2011)

Organism Cultural Response	Inoculum (CFU)	Growth
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9341	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	50-100	<i>luxuriant</i>
<b>Growth at 20-25°C for 5 days</b>		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	50-100	<i>luxuriant</i>

#### 2.6.4 Skim Milk

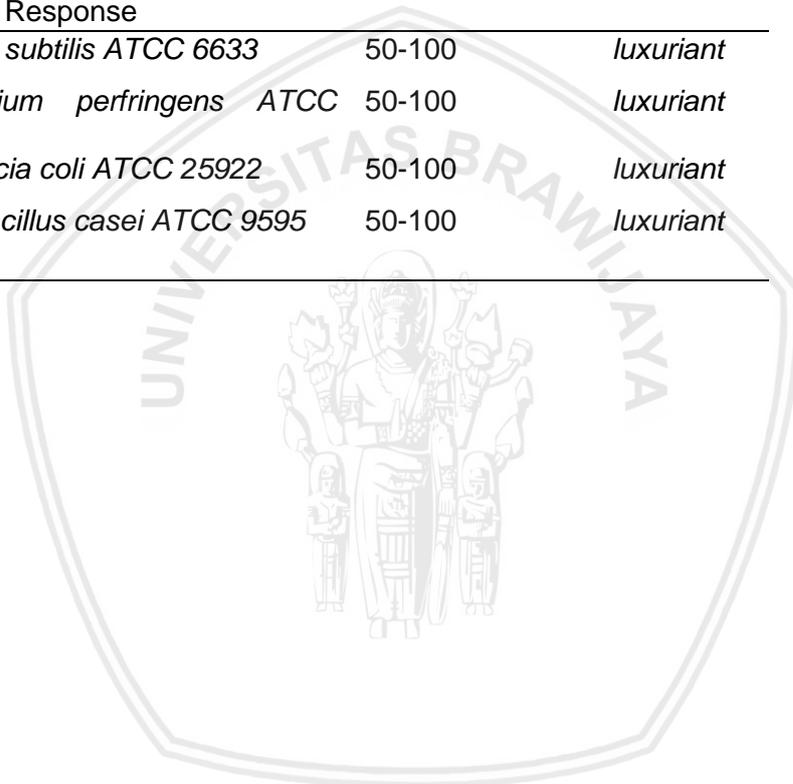
*Skim milk* merupakan media yang digunakan untuk budidaya dan pengelompokan mikroorganisme berdasarkan koagulasi dan proteolisis kasein. Media ini digunakan untuk memfasilitasi pertumbuhan organisme yang spesifik. Media ini memiliki pH berkisar antara 6,80 – 7,20. *Skim milk* bisa juga digunakan untuk pemeliharaan dan perbanyakan bakteri asam laktat (Himedialabs, 2012).

*Skim milk* merupakan media yang memiliki komposisi berupa *pancretic digest of casein* 5 g, *yeast extract* 2.5 g, *glucose* 1 g, dan *skim milk* 100 ml. Dalam pembuatan *skim milk broth* sedikit berbeda dengan media pertumbuhan lain. Siapkan *skim milk solution* dengan cara melarutkan *skim milk* dalam 100 ml akuades dan dihomogenkan. Lakukan *sterilisasi* dengan *autoclave* selama 15

menit dengan suhu 121°C dan diamkan hingga suhu 45<sup>0</sup>-50<sup>0</sup>C. Kemudian buat larutan *casein*, *yeast extract*, dan *glukose* dalam 1 liter akuades, lalu direbus dan *sterilisasi* dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C (Atlas, 2010). Adapun jenis bakteri yang dapat ditumbuhkan media *skim milk broth* dapat dilihat pada **Tabel 4**.

**Tabel 4.** Jenis Bakteri yang Dapat Tumbuh Pada Media *Skim Milk* (Himedialabs, 2012)

Organism Cultural Response	Inoculum (CFU)	Growth
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 12924	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Eschericia coli</i> ATCC 25922	50-100	<i>luxuriant</i>
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 9595	50-100	<i>luxuriant</i>



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

Pada penelitian ini terdiri dari alat dan bahan penelitian. Alat dan bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut.

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari sendok timbang, timbangan digital, erlenmeyer 50ml, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, autoklaf, *shaker incubator*, mikropipet 50-200 $\mu$ L (*Onemed*), mikropipet 20 $\mu$ L (*Water Pette*), mikropipet 1000 $\mu$ L (*Nichipet EX*), tip mikropipet 200 $\mu$ L dan 1000 $\mu$ L, jarum ose, botol vial, oven, inkubator, *beaker glass* 1L, *beaker glass* 500ml, bunsen, kamera digital, lap, *sentrifuge*, pH meter, cuvet, *waterbath*, tube 10 ml, *sentrifuge dingin (MicroCL 21R Centrifuge)*, *magnetic strirer*, *hotplate*, nampan, toples, showcase, pipet tetes, kompor.

##### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari Sampel saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp.*), *aquadest*, NaFis 0,9%, *Luria Bertani Broth* (LBB) dan *Luria Bertani Agar* (LBA), alkohol 70%, spirtus, plastik wrap, *alumunium foil*, kapas, tisu, 1.5% Casein, folin-ciocalteu, 0.4M TCA, 1M CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.55M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH, 0.1M Casein, *Skimmed Milk Agar* (SMA), *Nurtrient Broth* (NB), *Tryptone Soya Broth* (TSB), membran selofan, karet, benang kasur.

### 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini pada penelitian I menggunakan metode deskriptif eksploratif sedangkan pada penelitian II menggunakan metode eksperimen yang bersifat laboratoris. Penelitian deskriptif eksploratif adalah penelitian yang berupaya memaparkan atau menggambarkan fenomena dan pengumpulan data untuk menjawab persoalan yang menjadi minat peneliti (Mudjiyanto, 2018). Sedangkan metode eksperimen adalah suatu rancangan percobaan dengan setiap langkah tindakan yang terdefiniskan sehingga informasi yang berhubungan atau diperlukan untuk persoalan yang akan diteliti dapat dikumpulkan secara faktual. Maka metode eksperimen adalah suatu metode yang setiap langkahnya memiliki arti dan merupakan sesuatu yang harus dianalisis (Noor, 2014). Rancangan percobaan yang dilakukan adalah pengaruh variasi media pertumbuhan terhadap isolat terbaik yang menghasilkan aktivitas protease terbaik.

Penelitian ini memiliki dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel penelitian adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari orang, obyek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari yang kemudian ditarik kesimpulan. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab timbulnya variabel terikat. Sedangkan variabel terikat merupakan variabel yang menjadi akibat atau yang dipengaruhi karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2012). Variabel bebas pada penelitian ini pendahuluan adalah variasi media pertumbuhan bakteri. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah uji aktivitas proteolitik dan uji biokimia.

### 3.3 Rancangan Eksperimen

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan menggunakan 1 faktor, yaitu faktor variasi media pertumbuhan bakteri. Rancangan percobaan dalam penelitian ini disajikan pada **Tabel 5**. Data kemudian diolah menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*). Rancangan ini didapatkan pengulangan sebanyak 5 kali yang diperoleh dari rumus berikut:

$n = \text{perlakuan}; r = \text{ulangan}$

$$n(r - 1) \geq 15$$

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r = 5$$

Jadi, pada penelitian ini menggunakan r (ulangan) sebanyak 5 kali.

**Tabel 5.** Rancangan Percobaan

Perlakuan	Ulangan				
	1	2	3	4	5
<b>L</b>	L1	L2	L3	L4	L5
<b>N</b>	N1	N2	N3	N4	N5
<b>T</b>	T1	T2	T3	T4	T5
<b>S</b>	S1	S2	S3	S4	S5

Keterangan:

- L : Media pertumbuhan *Luria Bertani Broth*
- N : Media pertumbuhan *Nutrient Broth*
- T : Media pertumbuhan *Tryptone Soya Broth*
- S : Media pertumbuhan *Skim Milk Broth*

Langkah selanjutnya yaitu membandingkan antara F hitung dengan F tabel.

- Jika F hitung > dari F tabel 1%, aka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata
- Jika F hitung < dari F tabel 5%, maka perlakuan tidak berbeda nyata.

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

Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata ( $F \text{ hitung} > F \text{ tabel } 5\%$ ) maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

### 3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang digunakan terdiri dari dua tahap, yaitu penelitian I dan penelitian II. Penelitian I terdiri atas isolasi dan *screening* bakteri yang didalamnya termasuk uji biokimia, sedangkan pada penelitian II merupakan uji efek media terhadap produksi enzim.

#### 3.4.1 Penelitian I

##### a. Isolasi dan *Screening* Bakteri Proteolitik (Kurniasih *et al.*, 2013)

Sampel diperoleh dari pasar Dinoyo, Kota Malang, Jawa Timur. Sampel diambil secara *random* sebagai sampling pada pukul 07.30 WIB. Sampel lalu dibawa ke Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya untuk diisolasi.

Pengambilan saluran pencernaan ikan lele sebagai sumber inokulum dilakukan dengan cara mengeluarkan saluran pencernaan (lambung dan usus) dari ikan lele yang telah dimatikan, lalu diambil sebanyak 1 g ditambah dengan 9 ml garam fisiologis (NaCl 0,9%) steril dan dihomogenkan dengan *vortex*. Sumber inokulum diambil sebanyak 0,1 ml dan diencerkan dalam tabung pengenceran bertingkat yang berisi 0,9 ml larutan fisiologis, sebanyak 6 tabung pengencer (hingga pengenceran 6 kali). Setelah dihomogenkan, maka dari setiap tabung pengencer diambil larutan sebanyak 1 ose, dan digoreskan dalam cawan petri berisi LBA. Kultur ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sampai koloni bakteri dapat tumbuh, dalam suasana aerob. Koloni bakteri yang tumbuh

diidentifikasi berdasarkan perbedaan warna, bentuk, dan ukurannya. Setiap jenis koloni yang didapat dimurnikan dengan metode penggoresan kuadran, sampai didapatkan koloni bakteri yang tunggal dan seragam. Kultur murni selanjutnya diperbanyak atau diperkaya untuk mendapatkan isolat stok. Pengayaan dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing isolat ke dalam media TSB.

Untuk mendapatkan bakteri yang berpotensi tinggi sebagai penghasil enzim protease, maka seleksi bakteri dilakukan melalui tahapan pengujian aktivitas proteolitik secara kualitatif. Pengujian aktivitas proteolitik kualitatif ini bertujuan untuk mengukur besarnya aktivitas proteolitik masing-masing isolat dengan uji hidrolisis kasein. Aktivitas proteolitik kualitatif ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling isolat yang ditumbuhkan pada media *skim milk agar* yang mengandung kasein 2%. Uji hidrolisis kasein dilakukan dengan menyiapkan media *skim milk agar* yang mengandung kasein 2% dalam cawan petri dan menggoreskan 1 ose dari masing-masing tabung pengencer secara zigzag. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Isolat yang positif menghasilkan protease ditandai dengan terbentuknya zona jernih di sekeliling koloni, sebaliknya bila tidak terjadi hidrolisis protein maka daerah sekitar koloni tetap berwarna keruh. Zona jernih yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteri menggunakan susu skim yang terdapat pada medium sebagai nutriennya. Koloni isolat yang memiliki zona proteolitik tersebut diamati warna, ukuran diameter zona bening dan bentuk koloni. Isolat yang memiliki nilai aktivitas hidrolisis kemudian dibuat biakan murni pada media *luria bertani agar* miring dapat dilihat pada **Lampiran 3**. Menurut Kurniasih *et al.*, (2013) luas zona hidrolisis kasein dapat diukur dengan menggunakan rumus :

$$\text{Indeks Proteolitik (IP)} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{diameter sumuran}}{\text{Diameter sumuran}}$$

#### b. Uji Biokimia Isolat Terpilih (Sardiani *et al.*, 2015)

Isolat yang memiliki nilai aktivitas hidrolisis yang tinggi dikarakterisasi menggunakan sistem Microbact untuk menentukan identitas bakteri, karakter biokimia tersebut akan dibandingkan dengan Manual Bakteri Determinatif *Bergey's* (Prihanto *et al.*, 2018). Uji biokimia meliputi uji *Voges Proskauer* (VP), uji Indole, uji Katalase, uji Sitrat dan uji *Methyl Red* (MR). Karakterisasi sifat morfologi mencakup bentuk sel, motilitas, warna, tepi elevasi, pembentukan endospora dan sifat gram. Pewarnaan gram menggunakan pewarna kristal violet dan safranin untuk menentukan sifat gram. Motilitas diamati dengan menggunakan medium semi padat *Sulfide Indole Motily* (SIM). Sifat biokimia yang diamati mencakup:

##### 1. Uji VP (*Voges Proskauer*)

Inokulasikan 1 ose kultur murni pada medium VP cair dalam tabung reaksi dan diinkubasi 3x24 jam pada suhu 37°C. Media kemudian ditambahkan 0.2 ml KOH 40% dan 0.6 ml alfanol, lalu dikocok selama 30 detik. Amati perubahan warna pada media. Media akan berubah warna lembayung apabila hasil positif.

##### 2. Uji Motilitas dan Produksi Senyawa Indol

Inokulasikan 1 ose kultur murni dengan cara ditusuk pada media padat *Sulfide Indole Motily* (SIM) tegak dan diinkubasi 2x24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif (motil) apabila terdapat rambatan di sekitar bekas tusukan jarum pada media dan hasil negatif (non motil) apabila hasil tidak terdapat rambatan di sekitar bekas tusukan jarum ose. Pada masing-masing isolat ditambahkan dengan beberapa tetes senyawa kovacks untuk melihat produksi senyawa indol. Amati perubahan warna pada isolat. Warna akan berubah menjadi merah (cincin merah) apabila hasil positif.

### 3. Uji Katalase

Inokulasikan 1 ose bakteri dari kultur murni pada preparat dan ditambahkan 2-3 tetes reagen  $H_2O_2$  pada preparat. Amati adanya gelembung atau tidak. Hasil positif bila terbentuk gelembung gas dan hasil negatif jika tidak terbentuk gelembung gas.

### 4. Uji Sitrat

Sebanyak satu ose isolat diinokulasikan ke dalam *Simmon Citrat Agar* dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ C$  selama 24-48 jam. Warna biru menunjukkan reaksi positif dan warna hijau menunjukkan reaksi negatif.

### 5. Uji *Methyl Red* (MR)

Inokulasikan 1 ose kultur murni pada media MR cair dan diinkubasi 5x24 jam pada suhu  $37^\circ C$ . Kemudian ditambahkan sebanyak 5 tetes *methyl-red* pada isolat bakteri. Amati perubahan warna yang terjadi. Hasil menunjukkan positif jika terbentuk kompleks berwarna merah muda sampai merah yang mana menandakan bahwa bakteri tersebut menghasilkan asam.

### 6. Uji Pewarnaan Gram (Rahmawati, 2016)

Pewarnaan gram dilakukan dengan meneteskan 2 tetes akuades steril dengan ose pada bagian tengah kaca preparat. Bakteri diambil secara aseptik dan disuspensikan 1 ose pada akuades di permukaan kaca preparat. Angin-anginkan dan difiksasi dengan melewati kaca diatas api bunsen. Teteskan kristal violet (gram A) pada olesan dengan merata selama 30 detik lalu dialiri dengan akuades hingga tetesan tidak berwarna, lalu dikering anginkan. Kemudian teteskan larutan iodium (gram B) secara merata 30 detik lalu dialiri dengan akuades hingga tetesan tidak berwarna, lalu dikering anginkan. Teteskan etil alkohol (gram C) untuk dekolorisasi selama 10 detik dan segera dialiri dengan akuades. Setelah itu, teteskan safranin (gram D) selama 30 detik lalu dialiri dengan akuades dan di kering anginkan kembali. Amati kaca preparat dibawah mikroskop. Hasil daripada

pewarnaan gram berdasar pada jenis gram dari pada bakteri yang diamati, gram positif atau gram negatif dengan bentuk bulat, batang maupun bergelombang.

### 3.4.2 Penelitian II (Uji Efek Media terhadap Produksi Enzim)

#### a. Uji Kualitatif Aktivitas Proteolitik Isolat (Udhayashree *et al.*, 2012)

Masing-masing isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik ditumbuhkan pada media *Luria Bertani Broth* (LBB), *Nutrient Broth* (NB), *Tryptone Soy Broth* (TSB), *Skim Milk Broth* (SMB) dan diinkubasi dalam *shaker incubator* 200 rpm selama 24 jam dengan suhu 37°C. Skema pembuatan media dapat dilihat dalam **Lampiran 4**. Uji ini dilakukan menggunakan metode difusi sumuran agar pada cawan petri yang berisi media *skim milk agar* (SMA) dengan ukuran diameter sumuran 6 mm. Pada tiap sumuran dimasukkan sebanyak 10 µL inokulum bakteri. Menurut Haryati *et al.*, (2017) metode sumuran memiliki kelebihan yaitu lebih mudah dalam mengukur luas zona bening yang terbentuk, karena aktivitas isolat tidak hanya di permukaan atas medium agar tapi sampai ke bawah. Cawan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terdapat disekitar sumuran menandakan adanya aktivitas proteolitik. Aktivitas proteolitik kualitatif dapat dihitung dengan cara membandingkan diameter zona bening dengan diameter sumuran dan dapat menentukan Indeks Proteolitik (IP). Indeks proteolitik didapat dengan cara menghitung luas zona jernih di sekitar koloni bakteri berbanding luas koloni isolat bakteri atau ditulis dengan rumus:  $I = \text{luas zona total} / \text{luas koloni isolat}$  (Sumardi dan Lengkana, 2009).

#### b. Uji Kuantitatif Isolat Terpilih (Fitri *et al.*, 2005)

Isolat bakteri yang terpilih melalui uji kemampuan aktivitas proteolitik diinokulasikan ke dalam 5 ml medium cair yang berbeda, yaitu *Luria Bertani Broth* (LBB), *Nutrient Broth* (NB), *Tryptone Soy Broth* (TSB), *Skim Milk Broth* (SMB) dan

diinkubasi dalam *shaker incubator* 200 rpm selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kemudian inokulum dimasukkan ke dalam membran selofan dengan ukuran 12 kDa – 14 kDa. Cara menggunakan membran selofan adalah dengan merendam membran ke dalam larutan aquades hangat sampai terbuka kedua ujungnya. Lalu ikat dengan rapat tiap ujung membran menggunakan benang kasur. Selanjutnya, membran tersebut dimasukkan ke dalam *beaker glass* 1000 ml yang berisi larutan KPB dan *magnetic stirrer*. Skema pembuatan larutan KPB dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Setelah itu, *beaker glass* tersebut dimasukkan ke dalam toples berisi es serut. Penggunaan es serut bertujuan untuk menjaga suhu tetap stabil. Dialisis dilakukan pada suhu 4°C selama 24 jam dengan penggantian es tiap 2-3 jam sekali. Setelah itu, hasil dialisis pada medium produksi dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit, dalam keadaan dingin yaitu pada suhu 4°C, sehingga diperoleh endapan dan supernatan. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim protease ekstraseluler. Hasil dialisis tersebut digunakan untuk pengujian enzim (Zusfahair *et al.*, 2011). Skema proses dialisis disajikan pada **Lampiran 6**.

Sebanyak 0,5 ml H<sub>2</sub>O dicampurkan dengan 0,5 ml kasein 1,5% dan dimasukkan dalam *waterbath* suhu 30°C selama 5 menit. Kemudian 0,5 ml sampel ditambahkan pada campuran tersebut, lalu campuran tersebut dimasukkan dalam *waterbath* kembali pada suhu 30°C selama 10 menit. Setelah itu, TCA sebanyak 1,5 ml ditambahkan pada campuran tersebut dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan dari campuran tersebut diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan larutan 2,5 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,55M dan pereaksi folin sebanyak 0,5 ml. Supernatan tersebut dimasukkan dalam *waterbath* pada suhu 30°C selama 30 menit. Aktivitas protease kuantitatif dapat diukur berdasar kadar asam amino yang terbentuk sebagai produk hidrolisis protein oleh enzim protease dengan absorbansi 660 nm menggunakan spektrofotometer.

Prinsip penetapan metode Bergmeyer dan Grassi didasarkan bahwa kasein akan dihidrolisa oleh protease menjadi peptida dan asam amino. Asam amino dipisahkan dari substrat yang tersisa dengan penambahan TCA atau asam perklorat. Asam amino yang terbentuk akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap dengan adanya TCA. Asam amino yang telah diisolasi dapat langsung diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm atau diwarnai terlebih dahulu dengan pereaksi folin ciocalteau agar dapat dilakukan pembacaan pada sinar tampak (Fitriliyani, 2011). Satu unit aktivitas protease (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 $\mu$ g tirosin/menit/mL larutan enzim dari substrat kasein pada kondisi pengujian tersebut.

Dalam uji kadar protein dilakukan menggunakan *Nanodrop 2000 Spectrofotometer (Thermo Scientific)* dengan panjang gelombang 280 nm. Alat tersebut memiliki sensor dan bersifat sangat sensitif, maka dari itu hanya membutuhkan volume dari sampel sebanyak 1  $\mu$ L tiap kali pengukuran. Lalu, setelah didapat hasil aktivitas proteolitik dan kadar proteinnya, dilakukan pengolahan data untuk mendapatkan hasil aktivitas spesifik. Aktivitas spesifik merupakan pengukuran yang digunakan untuk mengukur kemurnian enzim. Adapun cara mencari aktivitas spesifik didapatkan dengan rumus:

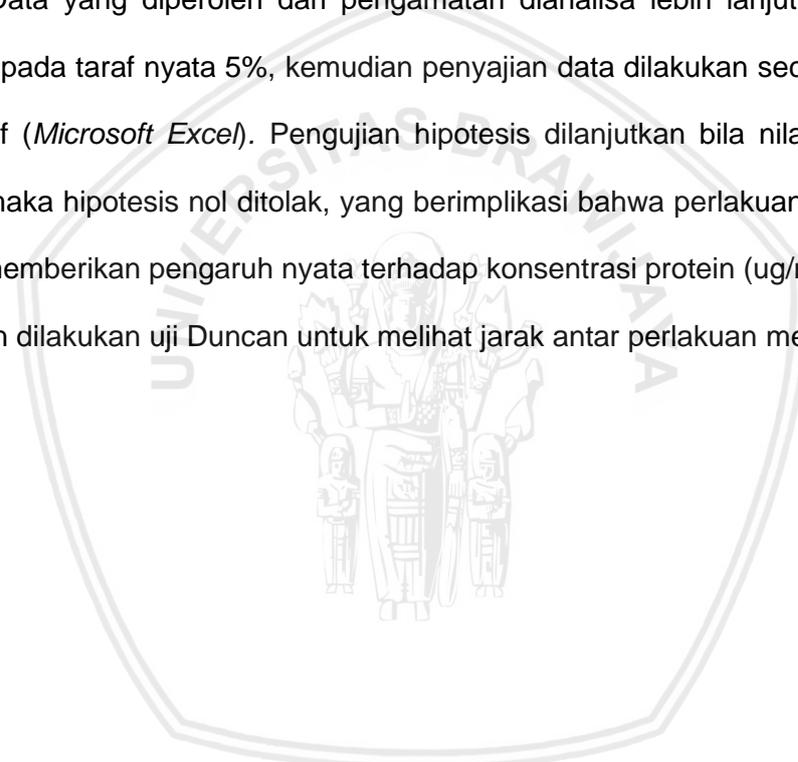
$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{Aktivitas Proteolitik}}{\text{Kadar Protein}}$$

### 3.5 Analisis Data

Data berupa hasil pengamatan morfologi dan biokimia dipaparkan secara deskriptif, sedangkan hasil berupa data kuantitatif Indeks zona bening dan aktivitas enzim protease dilakukan analisis varian dengan uji Duncan sebagai uji lanjut. Kondisi lingkungan serta perlakuan terhadap protease dikondisikan sama kecuali

perlakuan media pertumbuhan untuk inokulum, rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial. Perlakuan perbedaan media inokulum menggunakan 4 media berbeda yaitu media *Luria Bertani Broth* (LB), *Nutrien Broth* (NB), *Tryptone Soya Broth* (TSB) dan *Skim Milk Broth* (SMB) sebanyak 5 kali ulangan. Parameter yang diukur adalah konsentrasi protein (ug/ml) terhadap berbagai variasi media untuk mengetahui aktivitas enzim protease.

Data yang diperoleh dari pengamatan dianalisa lebih lanjut dengan uji Duncan pada taraf nyata 5%, kemudian penyajian data dilakukan secara analisis deskriptif (*Microsoft Excel*). Pengujian hipotesis dilanjutkan bila nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka hipotesis nol ditolak, yang berimplikasi bahwa perlakuan perbedaan media memberikan pengaruh nyata terhadap konsentrasi protein (ug/ml). Dengan demikian dilakukan uji Duncan untuk melihat jarak antar perlakuan media



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penelitian I (Isolasi dan *Screening* Bakteri Proteolitik)

#### 4.1.1 Penentuan Isolat Terbaik

Dari hasil isolasi yang telah dilakukan pada penelitian ini didapat 19 isolat bakteri proteolitik dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias sp.*) dengan diameter zona bening yang berbeda. Isolat penghasil zona bening dapat dilihat pada **Gambar 5** menunjukkan koloni yang mampu memanfaatkan protein untuk kelangsungan hidupnya akan membentuk zona bening di sekitar koloni. Zona bening merupakan seleksi awal dalam menentukan aktivitas enzim proteolitik, yang mengindikasikan kemampuan bakteri dalam memanfaatkan protein dengan terlebih dahulu merombak protein menjadi asam-asam amino. Dari hasil uji aktivitas proteolitik diperoleh isolat terbaik yang menunjukkan zona bening terbesar dengan metode sumuran dan ditentukan Indeks Proteolitik (IP) yang disajikan pada **Tabel 6**.



**Gambar 5.** Koloni Penghasil Zona Bening

**Tabel 6.** Pengamatan Zona Bening Jam ke 24

ISOLAT	INDEKS ZONA BENING (mm)	INDEKS PROTEOLITIK (mm)
1	19,25	2,26
2	9,75	1,15
3	2,75	0,32
4	11,75	1,38
5	4	0,47
6	5,25	0,62
7	0,75	0,09
8	16,25	1,91
9	7	0,82
10	2	0,24
11	0,25	0,03
12	4,75	0,56
13	8	0,94
14	14,5	1,71
15	2,25	0,26
16	2,55	0,30
17	7,25	0,85
18	1,75	0,21
19	0,25	0,03

Pada **Gambar 5**, dapat dilihat bahwa media susu skim pada cawan tersebut ada yang berwarna bening dan keruh. Isolat positif yang menghasilkan protease dapat membentuk zona bening disekitar koloni pada media tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri menggunakan susu skim yang terdapat pada medium sebagai *nutrientnya*. Menurut Kurniasih *et al.*, (2013), luas zona hidrolisis dapat dijadikan sebagai acuan dasar dalam seleksi bakteri proteolitik, hal ini mengindikasikan kemampuan suatu bakteri dalam memanfaatkan protein dengan cara merombak protein menjadi asam-asam amino. Menurut Melisha *et al.*, (2016) bahwa isolat bakteri yang menghasilkan zona bening dua atau tiga kali diameter koloni merupakan produsen enzim yang potensial. Adanya perbedaan zona bening pada isolat disebabkan oleh perbedaan jumlah dan aktivitas enzim dari bakteri yang disekresikan pada media.

Berdasarkan data dari **Tabel 6** dapat diketahui bahwa isolat 1 memiliki Indeks Proteolitik (IP) tertinggi dengan ukuran 2,26 mm jika dibandingkan dengan 18 isolat lainnya. Menurut Kabanse *et al.*, (2019) bahwa isolat bakteri memiliki

aktivitas pemecahan substrat protein dengan indeks IP sebesar 1,5 mm dapat dikatakan baik. Pada dasarnya semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua bakteri mempunyai enzim protease ekstraseluler. Kemampuan proteolitik yang berbeda disebabkan karena masing-masing spesies mikroba membutuhkan kultur optimum seperti pH, suhu dan nutrisi yang berbeda untuk memproduksi enzim dalam jumlah maksimal. Selain itu, faktor genetik juga mempengaruhi besarnya produksi enzim. Gen menentukan suatu pembentukan enzim yang berperan dalam rangkaian reaksi kimia pada saat berlangsungnya metabolisme sel yaitu anabolisme dan katabolisme. Gen setiap mikroorganisme berbeda - beda sehingga masing- masing mikroorganisme memiliki sifat yang berbeda. Dari tiap gen memiliki sifat yang spesifik untuk mengkode enzim - enzim tertentu. Beberapa jenis gen menurut fungsinya yaitu gen pengatur dan gen struktural. Gen struktural menentukan struktur enzim yaitu urutan asam aminonya sedangkan gen pengatur mengarahkan laju sintesis enzim (Sumardi dan Lengkana, 2009).

Isolat bakteri 1 merupakan isolat yang menghasilkan zona bening terbaik kemudian dimurnikan dan diamati morfologinya. Hasil pengamatan morfologi isolat terpilih secara visual disajikan pada **Gambar 6** dan **Tabel 7**.



**Gambar 6.** Isolat Murni Bakteri 1

**Tabel 7.** Karakteristik Morfologi Isolat

Isolat	Morfologi Koloni			
	Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	Putih kusam	Bulat	Tidak rata	Cembung

Koloni bakteri yang didapatkan memiliki karakter morfologis berwarna putih kusam dan berbentuk bulat sedang dengan pinggiran yang halus, ditemukan ada penggumpalan pada koloni sehingga akan tampak menggunung apabila dilihat dari samping agar. Identifikasi isolat dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi dan biokimia. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan sifat morfologi dan biokimia yang didapat dengan sifat bakteri pada literatur (Paskandani *et al.*, 2014).

#### 4.1.2 Identifikasi Spesies berdasarkan Karakter Fenotip

Identitas spesies berdasarkan Microbatch dilakukan dengan menggunakan uji biokimia diantaranya adalah uji *Methyl Red* (MR), uji Indole, uji *Voges Proskauer* (VP), uji Katalase dan uji Sitrat. Dari hasil beberapa uji yang telah dilakukan isolat bakteri terpilih memiliki kemiripan dengan kelompok spesies *Bacillus* sp. Hasil karakteristik isolat berdasar uji biokimia disajikan pada **Tabel 8** dan dokumentasi hasil pewarnaan gram dapat dilihat pada **Gambar 7**.

**Tabel 8.** Uji *Microbatch*

Uji Biokimia	Isolat 1	* <i>Bacillus</i> sp.
Uji Methyl Red	+	+
Uji Indole	-	-
Uji VP	+	+
Uji Katalase	+	+
Uji Sitrat	+	+
Endospora	+	+
Bentuk sel	Basil	Basil
Pewarnaan gram	+	+

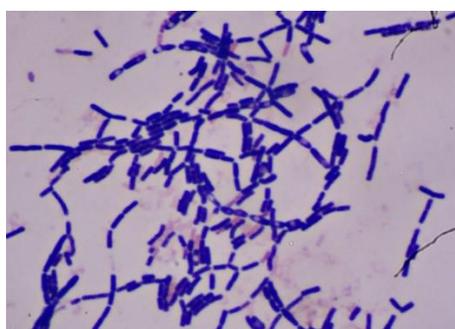
Sumber:\*(Priyono dan Nofal, 2009)

Keterangan: + = Positif  
- = Negatif



Berdasarkan **Tabel 8** Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa isolat terpilih merupakan *Bacillus* sp. Hal ini selaras dengan pernyataan Yuniati *et al.*, (2015) bahwa spesies *Bacillus* sp. merupakan salah satu mikroba penghasil enzim perotease yang potensial. *Bacillus* sp. juga efektif dalam melarutkan fosfat. Fosfat dapat menjadi tersedia untuk perakaran melalui sekresi asam organik mikroorganismenya. Pada pH netral dan basa yang memiliki kandungan kalsium yang tinggi, terjadi pengendapan kalsium fosfat, sehingga mikroorganismenya mampu melarutkan fosfat dan mengubahnya menjadi tersedia dan mudah diserap bagi tanaman (Avivi *et al.* 2010).

Bakteri dalam saluran pencernaan terutama hewan akuatik telah diketahui memiliki peran baik diantaranya bakteri pada genus *Bacillus*, *Bifidobacteri*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* dan *Micrococcus* telah terbukti sebagai bakteri yang menguntungkan dan dapat hidup berasosiasi sebagai flora normal pada organisme baik di dalam maupun di luar tubuh. Beberapa penelitian ditemukan bahwa penambahan *Bacillus* sp. mampu menghasilkan enzim protease dan lipase yang mana dapat mendegradasi asam amino dan dapat meningkatkan pertumbuhan. Bakteri *Bacillus* sp. mempunyai kemampuan mengsekresikan enzim protease, lipase dan amilase. *Bacillus* sp. merupakan bakteri proteolitik yang dapat menguraikan protein menjadi asam amino (Rahmawan *et al.*, 2014).



**Gambar 7.** Pewarnaan Gram

Pada **Gambar 7** hasil pewarnaan gram menunjukkan isolat bersifat gram positif. *Bacillus* spp membentuk endospora, merupakan gram positif, bergerak dengan adanya flagel peritrikus, dapat bersifat aerobik atau fakultatif anaerobik serta bersifat katalase positif atau silinder, yang terbentuk di dalam sel vegetatif. Endospora tersebut membedakan *Bacillus* sp. dari tipe-tipe bakteri pembentuk eksospora. Endospora yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. mempunyai ketahanan yang tinggi terhadap faktor kimia dan fisika, seperti suhu ekstrim, alkohol, dan sebagainya (Hatmanti, 2000).

Bakteri gram negatif akan berwarna merah pada saat dilakukan pewarnaan gram sedangkan bakteri gram positif berwarna biru keunguan. Hal ini disebabkan adanya lapisan dinding sel pada bakteri gram positif yang dapat menyerap warna biru keunguan pada safranin dan menyimpan warna tersebut sehingga pada saat dilakukan pencucian dengan alkohol warna biru keunguan tersebut tidak dapat keluar lagi. Hal sebaliknya pada bakteri gram negatif yang tidak dapat menyimpan warna biru keunguan dari kristal violet sehingga ketika dibilas dengan alkohol, warna tersebut akan tercuci. Biru keunguan adalah warna kristal violet yang mewarnai peptidoglikan. *Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif yang dapat membentuk endospora yang berbentuk oval di bagian sentral sel. Hasil uji pewarnaan gram menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif karena menghasilkan warna ungu saat ditetesi dengan larutan KOH. Warna ungu yang muncul pada pewarnaan gram tersebut dikarenakan dinding sel *Bacillus* sp. mampu mempertahankan zat warna kristal violet (Djaenuddin dan Muis, 2015).

Manfaat pewarnaan gram adalah dengan mengetahui bentuk bakteri tersebut maka dapat dikembangkan penggunaan dari bakteri tersebut. Bakteri gram negatif misalnya, dapat menjadi sumber lipopolisakarida karena bahan imunostimulan tersebut dapat digunakan untuk meningkatkan daya tahan tubuh

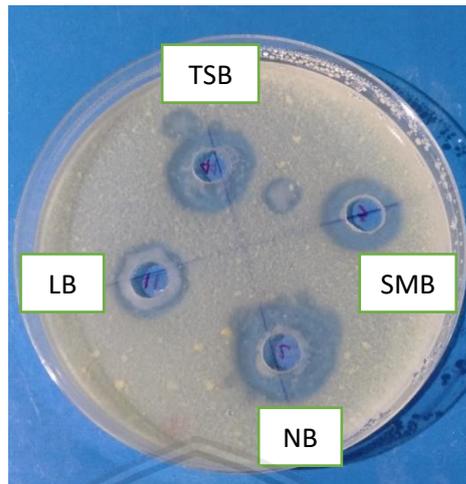
kultivan sedangkan pada bakteri gram positif hanya ditemukan peptidoglikan (Tampangallo *et al.*, 2013).

*Bacillus* sp. merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, bersel satu, berukuran 0,5–2,5  $\mu\text{m}$  x 1,2–10  $\mu\text{m}$ , bereaksi katalase positif, bersifat aerob atau anaerob fakultatif, dan heterotrof. *Bacillus* sp. memiliki fisiologi yang berbeda dari bakteri lain yang bukan patogen, yakni relatif mudah dimanipulasi secara genetik dan mudah pula dibiakkan sehingga dapat dikembangkan pada skala industri (Djaenuddin dan muis, 2015). Pada kondisi yang sesuai, populasi *Bacillus* sp. akan meningkat dua kali lipat dalam kurun waktu tertentu. Waktu ini dikenal dengan waktu generasi atau waktu penggandaan, yang untuk *Bacillus* sp. adalah 28,5 menit pada suhu 40°C. Apabila kondisi lingkungan tidak sesuai bagi pertumbuhannya, misalnya karena suhu tinggi, tekanan fisik dan kimia, atau kahat nutrisi, bakteri akan membentuk endospora. Endospora akan berkembang jika kondisi lingkungan sesuai (Suriani dan Muis, 2016).

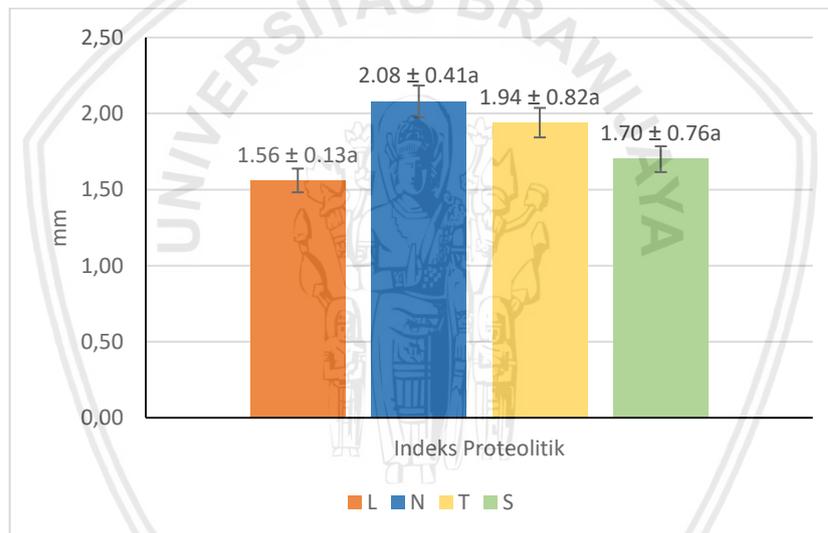
## 4.2 Penelitian II (Efek Media Terhadap Produksi Protease)

### 4.2.1 Hasil Uji Kualitatif Isolat Terpilih

Media yang digunakan dalam proses ini adalah susu skim. Susu skim mengandung kasein yang akan terhidrolisis oleh enzim proteolitik bakteri menjadi peptida dan asam amino yang larut. Hilangnya partikel kasein di dalam media susu skim ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Hal ini merupakan indikator bahwa isolat mampu merombak kasein dalam media susu skim. Uji kualitatif aktivitas proteolitik ini ditandai dengan munculnya zona bening disekitar lubang sumuran. Uji ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim ekstraseluler bakteri. Hasil pengamatan uji kualitatif aktivitas proteolitik disajikan pada **Gambar 8** dan **Gambar 9**.



**Gambar 8.** Hasil Uji Kualitatif Aktivitas Proteolitik



**Gambar 9.** Grafik Indeks Proteolitik Isolat Terpilih

Keterangan: L = *Luria Bertani Broth*  
 N = *Nutrient Broth*  
 T = *Tryptone Soya Broth*  
 S = *Skim Milk Broth*

Berdasarkan gambar tersebut didapat zona bening di sekitar sumuran, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mendegradasi kasein pada media *skim milk agar* (SMA). Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona jernih di sekitar koloni dengan besarnya diameter

koloni. Besar aktivitas enzim proteolitik ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona jernih tetapi besarnya aktivitas enzim proteolitik yang berperan merombak protein dalam medium padat tidak dapat diketahui dan diukur secara kuantitatif. Berdasarkan grafik di atas dapat dilihat bahwa pada setiap media memiliki nilai Indeks Proteolitik (IP) yang berbeda-beda. Hasil tertinggi ditunjukkan pada media *Nutrient Broth* dengan menunjukkan diameter indeks proteolitik paling besar yaitu 2.08 mm dan terendah ditunjukkan pada media *Luria Bertani* dengan hasil 1.56 mm.

Menurut Melisha et al., (2016) bahwa bakteri banyak memproduksi zat-zat metabolit sekunder yang dibutuhkan untuk mempertahankan kehidupannya, salah satunya adalah enzim, yang mana masing-masing substrat yang digunakan membutuhkan waktu yang berbeda untuk mencapai tiap fase. Perbedaan waktu tersebut dapat dipengaruhi oleh suhu, pH, sumber energi, sumber karbon, lingkungan, oksigen, sifat mikroorganisme tersebut. Pada penelitian ini, kondisi isolat dibuat sama, maka perbedaan waktu untuk mencapai fase logaritmik bakteri dipengaruhi oleh sifat masing-masing substrat.

Menurut Yempita et al., (2017) bahwa hasil perombakan polimer protein hanya ditunjukkan dengan adanya zona jernih yang menandakan protein telah dirombak menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam medium. Namun, kemampuan mikroba dalam menguraikan protein (proteolytic ability) berbeda antara satu spesies dengan spesies yang lainnya. Setiap mikroba menghaikan enzim yang berbeda sehingga aktivitas yang dihasilkan juga berbeda (Paskandani et al., 2014).

#### 4.2.2 Hasil Uji Kuantitatif Isolat Terpilih

Protease merupakan enzim proteolitik, yaitu enzim yang dapat menguraikan atau memecah protein menjadi rantai peptide yang lebih pendek dan asam amino

bebas. Aktivitas proteolitik dapat dinyatakan dalam (U/ml) yang mana satu unit (U) menyatakan jumlah enzim yang dapat mengkatalisis substrat kasein untuk mendapatkan 1  $\mu$ mol tirosin. Adapun hasil uji kuantitatif isolat terpilih disajikan pada **Tabel 9**.

**Tabel 9.** Uji Kuantitatif Isolat 1

Media	Aktivitas Proteolitik (U/ml)	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
L	14.357 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	0.394 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	36.479 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>
N	17.385 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	0.928 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	18.783 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>
T	28.119 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	1.172 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	24.035 $\pm$ 0,89 <sup>c</sup>
S	18.286 $\pm$ 0,83 <sup>c</sup>	1.142 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	16.061 $\pm$ 0,72 <sup>d</sup>

\*a,b,c,d menunjukkan perbedaan antar perlakuan

Keterangan: L = *Luria Bertani*

N = *Nutrient Broth*

T = *Tryptone Soya Broth*

S = *Skim Milk Broth*

Berdasarkan grafik di atas dapat dilihat bahwa isolat terpilih memiliki nilai aktivitas proteolitik, kadar protein dan aktivitas spesifik yang berbeda-beda pada tiap media pertumbuhan. Perlakuan terbaik dari aktivitas proteolitik dan kadar protein ditunjukkan pada media *Tryptone Soya Broth* dengan nilai berturut-turut adalah sebesar 28,119 (U/ml) dan 1,172 (mg/ml). Sedangkan untuk aktivitas spesifik perlakuan terbaik ditunjukkan pada media *Luria Bertani Broth* dengan nilai sebesar 36,479 (U/mg protein) hal ini disebabkan pada saat perhitungan aktivitas spesifik didapatkan dari pembagian aktivitas proteolitik dengan total kadar protein, oleh karena itu jika aktivitas proteolitik tinggi dengan total kadar protein sebagai pembagi rendah maka akan didapat aktivitas spesifik dengan nilai yang tinggi. Hal tersebut dikarenakan, dari total kadar protein yang didapat belum dapat diidentifikasi apakah enzim tersebut masih ada kontaminan atau tidak. Menurut Yuniati *et al.*, (2015) bahwa aktivitas spesifik dinyatakan dalam (U/mg) yang merupakan hasil bagi dari aktivitas enzim protease (U/ml) dengan kadar protein (mg/ml) dan digunakan untuk menunjukkan kemurnian enzim.

Pada penelitian ini adanya aktivitas protease yang tinggi dipengaruhi oleh sumber dari isolat terpilih meliputi spesies, habitat dan pakan, serta kondisi ikan lele (*Clarias sp.*) pada saat dilakukan sampling. Hal ini didukung oleh pernyataan Nurhayati *et al.*, (2014) bahwa aktivitas masing-masing enzim pencernaan pada ikan berkembang secara bervariasi bergantung kepada spesies ikan, kebiasaan makan, dan komposisi biokimiawi pakan tersebut. Rendahnya aktivitas enzim protease pada perlakuan pemberian pakan buatan 100% (PB), diduga karena tidak ada tambahan dari pakan alami seperti pada perlakuan lainnya sehingga aktivitas enzim yang terdeteksi rendah.

Menurut Chakrabarti *et al.*, (2006) adanya aktivitas protease yang tinggi berkaitan dengan peran pankreas dalam sekresi enzim yang bekerja saat ikan dalam fase pertumbuhan. Pankreas pada ikan yang masih dalam masa pertumbuhan akan lebih aktif mensekresi enzim pencernaan. Pankreas yang mensekresi enzim dalam jumlah sedikit menyebabkan aktivitas enzim di saluran pencernaan akan rendah, sebaliknya apabila sekresinya banyak maka aktivitasnya akan meningkat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Al Gadri *et al.*, (2014) bahwa kemampuan dari usus ikan sampel dalam menghasilkan aktivitas enzim pencernaan berkorelasi dengan jumlah enzim aktif untuk mencerna pakan yang dikonsumsi.

Dalam proses produksi enzim protease tidak hanya dipengaruhi oleh dari mana isolat yang digunakan diisolasi, akan tetapi banyak faktor yang mempengaruhi antara lain waktu dan suhu inkubasi inokulum, pH pada buffer dan media yang digunakan, komposisi dan konsentrasi substrat yang tepat untuk pertumbuhan *Bacillus sp.* Hal ini sesuai dengan pernyataan Rosnawita *et al.*, (2015) bahwa produksi protease mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan suhu inkubasi, dan setelah suhu optimum produksi protease tercapai maka laju katalitik enzim mengalami penurunan. Peningkatan suhu yang melebihi suhu

optimum menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim. Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun. Aktifitas enzim yang berbeda kemungkinan disebabkan oleh jumlah enzim dan sekuen asam amino yang dihasilkan.

Tinggi rendahnya aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dan substrat. Nilai aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan penambahan substrat, namun pada suatu titik penambahan konsentrasi substrat tidak akan meningkatkan aktivitas dari enzim tersebut, hal ini disebabkan karena enzim telah mencapai titik kejenuhan (Sutrisno, 2017).

Adanya perbedaan hasil dari masing-masing uji di atas menunjukkan bahwa adanya pengaruh dari tiap media pertumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini. Isolat terpilih yang merupakan bakteri *Bacillus* sp. mampu hidup dan memproduksi enzim protease pada tiap media pertumbuhan. Akan tetapi, perbedaan *output* dapat dipengaruhi oleh komposisi dari media pertumbuhan yang digunakan. *Bacillus* sp. akan memproduksi enzim yang lebih banyak apabila media pertumbuhan yang digunakan memiliki komposisi nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan metabolismenya.

Menurut Giyanto *et al.*, (2009) salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri selain kondisi untuk pertumbuhan seperti suhu, pH, kadar air, aerasi dan agitasi, juga sangat ditentukan oleh kandungan nutrisi media perbanyakannya. Kandungan nutrisi yang lengkap menyebabkan pertumbuhan populasi/jumlah koloni *Bacillus* sp. cukup baik dan stabil selama dalam proses penyimpanan. Semakin berkurang nutrisi di dalam media maka jumlah sel semakin menurun. Berkurangnya komposisi nutrisi dalam media disebabkan karena nutrisi tersebut dimanfaatkan oleh bakteri untuk

perkembangbiakannya. Kematian bakteri disebabkan karena zat makanan yang diperlukan berkurang. Menurut Paskandani *et al.*, (2014) bahwa ketika mikroorganisme menggunakan sumber daya yang sama dalam tumbuh kembangnya, maka kompetisi antar mikroorganisme akan meningkat. Kompetisi ini akan menyebabkan beberapa mikroba tereliminasi. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi media berperan penting dalam pertumbuhan *Bacillus sp.*

Menurut Nasrah *et al.* (2012), penggunaan sumber karbon dan nitrogen yang baik dalam media dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan pada mikroorganisme. Menurut Poernomo *et al.*, (2017), peningkatan produksi protease oleh sumber nitrogen organik seperti tripton, pepton, dan ekstrak ragi. Sumber nitrogen organik telah ditemukan untuk menjadi sumber nitrogen yang lebih baik untuk pertumbuhan dan produksi protease dalam beberapa organisme dan sumber nitrogen anorganik (ammonium sulfat dan kalium nitrat) memberikan hasil enzim yang lebih baik.

Pada *tryptone soya broth* terdapat kombinasi pencernaan pankreas dari kasein dan pencernaan papain dari bungkil kedelai yang membuat mediumnya bergizi dengan menyediakan asam amino dan peptida rantai panjang untuk pertumbuhan mikroorganisme. Dextrose dan kalium fosfat dibasik berfungsi sebagai sumber karbohidrat dan buffer, masing-masing dalam medium. Sedangkan sodium klorida menjaga keseimbangan osmotik medium (Himedialab, 2011). Media *tryptone soy broth* mengandung kasein dan pepton kedelai yang menyediakan asam amino dan substansi nitrogen lainnya yang membuatnya menjadi media bernutrisi untuk bermacam mikroorganisme. Dextrosa adalah sumber energi dan natrium klorida berfungsi mempertahankan kesetimbangan osmotik (Khaeruni *et al.*, 2013). Sedangkan nilai terendah didapat pada media *luria bertani broth*, hal ini diduga karena komposisi media pada *luria bertani* sangat sedikit nutrisi jika dibandingkan dengan media lainnya sehingga hanya *strain*

bakteri tertentu yang mampu bertahan hidup dengan baik. Pada *Luria bertani* terdapat hidrolisat enzimatis kasein yang menyediakan peptida dan pepton, sementara adanya kandungan vitamin B kompleks disediakan oleh ekstrak ragi dan sodium klorida yang menyediakan ion natrium untuk transportasi membran dan juga mempertahankan keseimbangan osmotik medium (Himedialab, 2015).



## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

- a) Pada isolasi bakteri dari saluran pencernaan ikan lele (*Clarias* sp.) diperoleh 19 isolat bakteri terdapat 1 isolat bakteri yang potensial sebagai penghasil enzim protease yaitu *Bacillus* sp.,
- b) Kandungan nutrisi dalam media produksi dapat mempengaruhi produksi enzim protease ekstraseluler yang dihasilkan. Hasil aktivitas proteolitik tertinggi diperoleh dari media *tryptone soya broth* sebesar 28,119 U/ml dan hasil terendah diperoleh dari media *luria bertani broth* sebesar 14,357 U/ml. Begitu pula dengan kadar protein tertinggi diperoleh dari media *tryptone soya broth* sebesar 1,172 mg/ml dan hasil terendah diperoleh dari media *luria bertani broth* sebesar 0,394 mg/ml. Sedangkan untuk hasil aktivitas spesifik tertinggi diperoleh dari media *luria bertani broth* sebesar 36,479 U/mg dan hasil terendah diperoleh dari media *skim milk broth* sebesar 16,061 U/mg.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat saya berikan adalah pada pembuatan inokulum lebih diperhatikan lagi saat pengambilan bakteri, sehingga tingkat bakteri yang mati saat diisolasi dapat diminimalisir serta pada saat penyimpanan isolat lebih diperhatikan kerapatan tutupnya agar tidak terkontaminasi dari luar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al Gadri, S.F., U. Susilo dan S. Priyanto. 2014. Aktivitas protease dan amilase pada hepatopancreas dan intestine ikan nilam (*Osteochillus hasselti*). *Scripta Biologica*. **1** (1)
- Akbar, J.2014. Potensi dan Tantangan Budidaya Ikan Rawa (Ikan Hitam dan Ikan Putih) di Kalimantan Selatan. *Unlam Press*: Banjarmasin.
- Atlas, R. M. 2010. Handbook Of Microbiological Media. *Fourth edition*. Crc press: 973, 1303, 1575, 1822.
- Arfarita, N. 2015. Isolasi dan identifikasi bakteri penghasil protease yang diskriming dari terasi. *El-hayah*. **5** (3) : 119-122.
- Arifiani, N dan S. N. Ethica. 2018. Isolasi bakteri penghasil lipase dan protease yang berpotensi sebagai agen bioremediasi dari limbah biomedis cair puskesmas halmahera kota semarang. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*. **1** : 268-275.
- Artika, W. 2010. Produksi dan pengukuran aktivitas protease dari isolat bakteri bkl-1 dan bku-31. *Jurnal Biologi Edukasi*. Unsyiah Darussalam Banda Aceh.
- Avivi, S., I. S. Suyani dan S. Winarso. 2010. Efek bakteri pelarut fosfat terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus* pada perkecambahan kacang tanah. *J. Hpt Tropika*. **10** (1) : 64 – 72.
- Azizati, V . I., A. Sudaryono dan T. Yuniarti. 2015. Pengaruh penambahan kombinasi omegasqua dan klorofil terhadap fekunditas, daya tetas dan kelulusanhidup larva ikan lele sangkuriang (*Clarias sp.*). *Journal Of Aquaculture Management And Technology*. **4** (4) : 136-140.
- Baehaki A., Rinto dan A. Budiman. 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa indralaya, sumatera selatan. *J. Teknol dan Industri Pangan*. **22** (1) :40-45.
- [BPS] Badan pusat statistik kabupaten malang. 2010. Kabupaten malang dalam angka 2010. Tersedia pada <http://www.malangkab.bps.go.id>
- Diarti, M. W., Y. S. K. Achmad., dan Y. Jiwintarum. 2017. Karakteristik morfologi, koloni dan biokimia bakteri yang diisolasi dari sedimen laguna perindukan nyamuk. *Jurnal Kesehatan Prima*. **11** (2): 124-136.
- Djaenuddin, N. dan A. Muis. 2015. Karakteristik bakteri antagonis bacillus subtilis dan potensinya sebagai agens pengendali hayati penyakit tanaman. *Prosiding Seminar Nasional Serealia*. 489-494.
- Eed, J. 2013. Factors Affecting Enzyme Activity. *The Berkeley Electronic Press*. **10** (19) :48-51.
- Fitri, S. G. S., M. N. R dan T. S. P. 2005. Produksi dan karakterisasi protease ekstraseluler *Bacillus sp.* Galur bku-10 yang diisolasi dari saluran pencernaan *Epinephelus tauvina*. *Mikrobiol Indonesia*. 9-12.
- Fitriliyani, I. 2011. Aktifitas enzim saluran pencernaan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan pakan mengandung tepung daun lamtoro (*Leucaena*

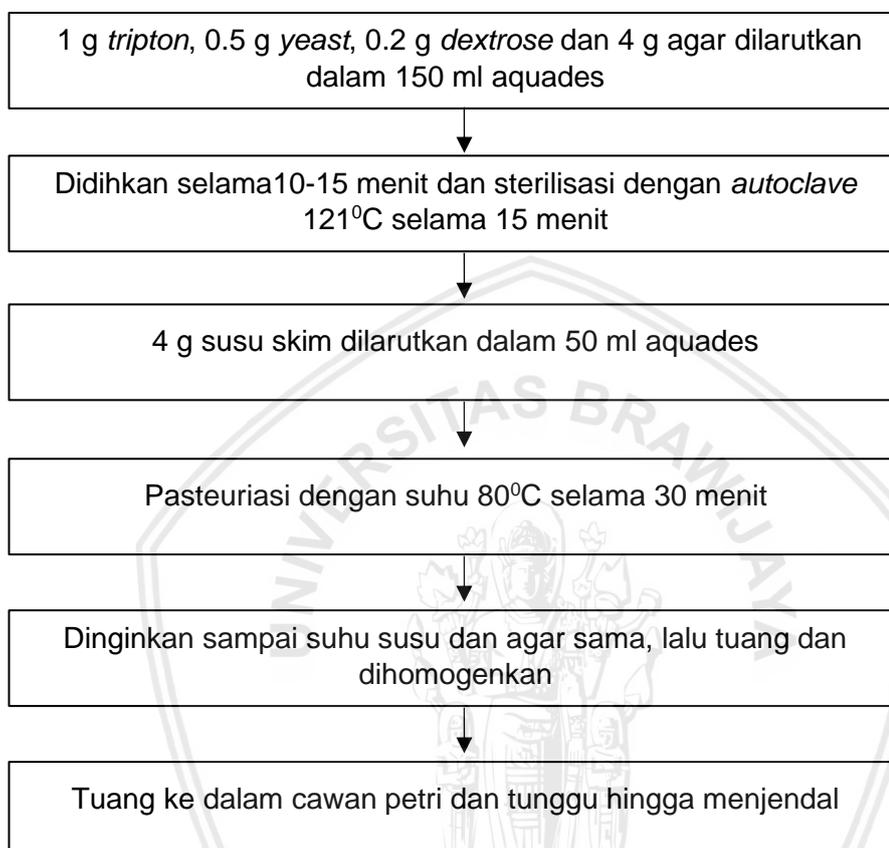
- leucophala*) terhidrolisis dan tanpa hidrolisis dengan ekstrak enzim cairan rumen domba. *Bioscientiae*. **8** (2): 16-31.
- Giyanto A., Suhendar dan Rustam. 2009. Kajian pembiakan bakteri kitinolitik *Pseudomonas fluorescens* dan *Bacillus* sp. Pada limbah organik dan formulasinya sebagai pestisida hayati (bio-pesticide). *Prosiding Seminar Hasil Penelitian*. IPB
- Gupta, R., Q. K. Beg and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases : molekular approaches and industrial applications. *Applied Microbial Biotechnology*. 59: 15-32.
- Hadiroseyani, Y., P. Hariyadi dan S. Nuryati. 2006. *Inventarisasi parasit lele (clarias sp). Di daerah bogor*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 5(2): 167-177.
- Hasan, B., D. D. Iriani, T. Nugroho, M. A. Arifin dan A. Syatapahana. 2015. Aktivitas enzim protease dan lipase viscera ikan kembung (*Restrelliger* sp.) pada ph dan konsentrasi garam berbeda. *Berkala Perikanan Terubuk*. **43** (2): 68 – 76.
- Haryati, S.D., S. darmawati dan W. Wilson.2017. Perbandingan efek ekstrak buah alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode disk dan sumuran. *Prosiding Seminar Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*. **25** (1) : 31-41.
- Hidayat. N., M. Irene dan Y. Neti. 2018. Mikroorganisme dan Pemanfaatannya. *UB Press*. Malang. 198 hlm.
- Himedialabs. 2012. Modified skim milk agar. *Technical data*. M1213.
- Himedialabs. 2011. Tryptone soya broth. *Technical data*. Lq508.
- Himedialabs. 2018. Nutrient broth. *Technical data*. M002.
- Himedialabs. 2015. Luria bertani broth, miller. *Technical data*. M1213.
- Kabense. R., E. L. Ginting, S. Wullur, N. J. Kawung, F. Losung dan J. L. Tombokan. 2019. Penapisan bakteri proteolitik yang bersimbiosis dengan alga *Gracillaria* sp. *Jurnal ilmiah platax*. **7** (2) : 413-418.
- Kasipah, C., Sinta Rismayani, Ihsanawati dan Z. Nurachman. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil enzim lipase ekstraseluler dari lumpur aktif instalasi pengolahan air limbah industri tekstil. *Jurnal Ilmiah Arena Tekstil*. **28** (1) : 1 – 46.
- Khaeruni, A., Asrianti dan A. Rahman. 2013. Efektivitas limbah cair pertanian sebagai media perbanyakan dan formulasi *Bacillus subtilis* sebagai agens hayati patogen tanaman. *Jurnal Agroteknos*. **3** (3): 144-151
- Kosim, M. dan S. R. P. 2010. Pengaruh suhu pada protease dari *Bacillus subtilis*. *Prosiding Skripsi Semester Genap*. FMIPA ITS: Surabaya.
- Kumar D, Savitri, Thakur N, Verma R, Bhalla TC. 2008. Microbial protease and application as laundry detergent additive. *Jurnal Microbiol*. **3** (12): 661-672.

- Kurniasih, T., Widanarni, Mulyasari, I. Melati., Z. I. Azwar dan A. M. Lusiastuti. 2013. Isolasi, seleksi, dan identifikasi bakteri dari saluran pencernaan ikan lele sebagai kandidat probiotik. *J. Ris. Akuakultur*. **8** (2): 277-286.
- \_\_\_\_\_, A.M. Lusiastuti, Z.I. Azwar dan I. Melati. 2013. Isolasi dan seleksi bakteri saluran pencernaan ikan lele sebagai upaya mendapatkan kandidat probiotik untuk efisiensi pakan ikan. *J. Ris. Akuakultur*. **9** (1): 99-109.
- Kurniawati, A. 2015. Isolasi, seleksi dan identifikasi bakteri penghasil enzim ekstraseluler dari saluran pencernaan dan sedimen tambak budidaya udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) intensif. *Skripsi*. Universitas airangga. Surabaya
- Kusumawardani, P. A., R. B. Jakaria dan A. Akbar. 2018. Pkm kelompok usaha lele jawa timur. **15** : 25-29, diakses pada 10 Agustus 2019 versi online / url : <http://ejournal.umm.ac.id/index.php/dedikasi/issue/view/584>
- Manullang, Y., I. Santoso dan Tarsim. 2018. Pengaruh substitusi tepung ikan dengan tepung kepala ikan patin (*Pangasius* sp.) terhadap pertumbuhan ikan lele sangkuriang (*Clarias* sp.). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. **6** (2) :129-140.
- Melisha, E.Harpeni dan Supono. 2016. Produksi dan pengujian aktivitas amilase *Burkholderia cepacia* terhadap substrat yang berbeda. e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan. **5** (1).
- Mudjiyanto, B. 2018. Tipe penelitian eksploratif komunikasi. *Jurnal Studi Komunikasi Dan Media*. **22** (1) : 65-74.
- Nafis , M., Zainuddin dan D. Masyitha. 2017. Gambaran histologi saluran pencernaan ikan gabus (*Channa striata*). *JIMVET*. **1** (2): 196-202.
- Noor, J. 2014. Metodologi penelitian: skripsi, tesis, disertasi, dan karya ilmiah. Jakarta: Kencana Prenadamedia Group. 313 hlm.
- Oktavianto, D, U. Susilo dan S. Priyanto. 2014. Respon aktivitas amilase dan protease ikan gurami *Osphronemus gouramy* lac. terhadap perbedaan temperatur air. *Scripta Biologica*. **1** (4): 14-18.
- Paskandani, R., Ustadi dan A. Husni. 2014. Isolasi dan pemanfaatan bakteri proteolitik untuk memperbaiki kualitas limbah cair pengolahan bandeng presto. *J. Manusia dan Lingkungan*. **21** (3) : 310-316.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta : Erlangga.
- Poernomo, A.T., Isnaeni, Sugianto, D.A. Purwanto, A.C. Dewi, D. Suryagama. 2017. Pengaruh nutrisi pada produksi dan karakterisasi protease dari bakteri termofilik isolat LS-1 lumpur Sidoarjo. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **4** (2):52-59
- Prihanto, A.A., A. Fatchiyah, H. Kartikaningsih dan K. A. Pradarameswari. 2018. Identifikasi bakteri endofit mangrove api-api putih (*Avicennia marina*) penghasil enzim L-asparaginase. *JIPK*. **10** (2) : 84-90.
- Priyono, F.H dan M. Nofal. 2009. Isolasi dan identifikasi *Bacillus* sp. sebagai bakteri pendegradasi kontaminan hidrokarbon pada proses bioremediasi. IPB: Bogor.

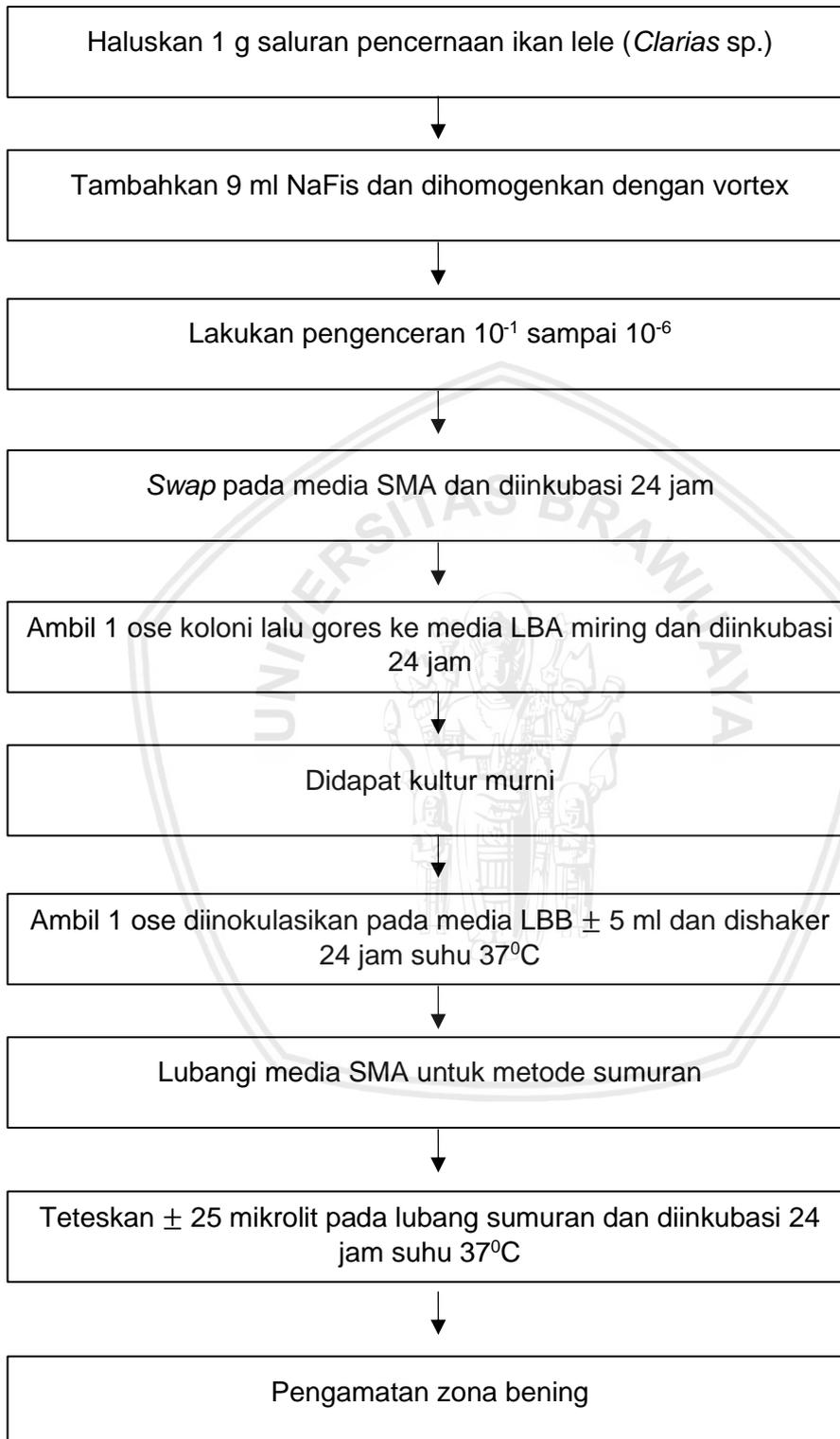
- Rahmawan, M. E. A., Suminto, V. E. Herawati. 2014. Penggunaan bakteri kandidat probiotik pada pakan buatan terhadap efisiensi pemanfaatan pakan, pertumbuhan dan kelulushidupan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *Journal Of Aquaculture Management And Technology*. **3** (4) : 257-264.
- Rahmawati, N. H. F. 2016. Isolasi dan karakterisasi bakteri proteolitik dari feses hewan luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*). *Jurnal Biologi*. **5** (4) : 62-69.
- Roosdiana A, K. H., Suharjo, P. R dan Murdinah. 2002. Isolasi dan karakterisasi *Bacillus* sp. penghasil protease dari kulit ikan kakap merah (*Lutjanus sanguineus*). *J Ilmu-ilmu Hayati*. **14** : 202-210.
- Rosnawita, M., A. Agustien, dan N. Nasir. 2015. Pengaruh faktor abiotik terhadap produksi protease dari isolat bakteri m1-23. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. **4** (1) : 45-49.
- Sardiani, N., M. Litaay., R. G. Budji., D. Priosambodo., Syahribulan., Z. Dwyana. 2015. Potensi tunikata *Rhopalaea* sp. sebagai sumber inokulum bakteri endosimbion penghasil antibakteri: karakteristik isolat. *Jurnal Alam Dan Lingkungan*. **6** (11).
- Sholihati, A. M., M. Baharuddin dan Santi. 2013. Produksi dan uji aktivitas enzim selulase dari bakteri *Bacillus subtilis*. *Al Kimia*. 78-90.
- Sitio, M. H. F., D. Jubaedah dan M. Syaifudin. 2017. Kelangsungan hidup dan pertumbuhan benih ikan lele (*Clarias* sp.) Pada salinitas media yang berbeda. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. **5** (1): 83-96.
- Sugiyono. 2012. Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif Dan R&D. Bandung: alfabeta. 256 hlm.
- Sumardi dan D. Lengkana. 2009. Isolasi *bacillus* penghasil protease dari saluran pencernaan ayam kampung Lampung. *Seminar Hasil Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat*. Universitas Lampung. 164-171.
- Suriani dan A. Muis. 2016. Prospek *bacillus subtilis* sebagai agen pengendali hayati patogen tular tanah pada tanaman jagung. *J. Litbang Pert.* **35** (1): 37-45.
- Susanti, R. dan F. Fibrina. 2017. Teknologi Enzim. Andi: Yogyakarta. 210 hlm.
- Susilo, U., N. Setyaningrum dan F. N. Rachmawati. 2013. Aktivitas protease dan komposisi proksimat tubuh ikan sidat (*Anguilla bicolor* McClelland) pada kondisi puasa dan pemberian pakan kembali. *Biosfera*. **30** (2) : 96-103.
- Sutrisno, A. 2017. Teknologi Enzim. Ub Press. Malang. 130 hlm.
- Su'udi, M dan S. Wathon . 2018. Peningkatan performa budidaya lele dumbo (*Clarias gariepinus*, burch) di desa serut kecamatan panti kabupaten Jember provinsi Jawa Timur. *Warta pengabdian*. **12** (2) : 298-306.
- Suptijah, P. 1998. Ekstraksi protease dari Limbah ikan tuna. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. **5** (1) :28-32.
- Taufik, M., Hana dan U. Susilo. 2017. Aktivitas protease dan amilase pada ikan sidat (*Anguilla bicolor* McClelland). *Scripta Biologica*. **4** (3) : 183-188.

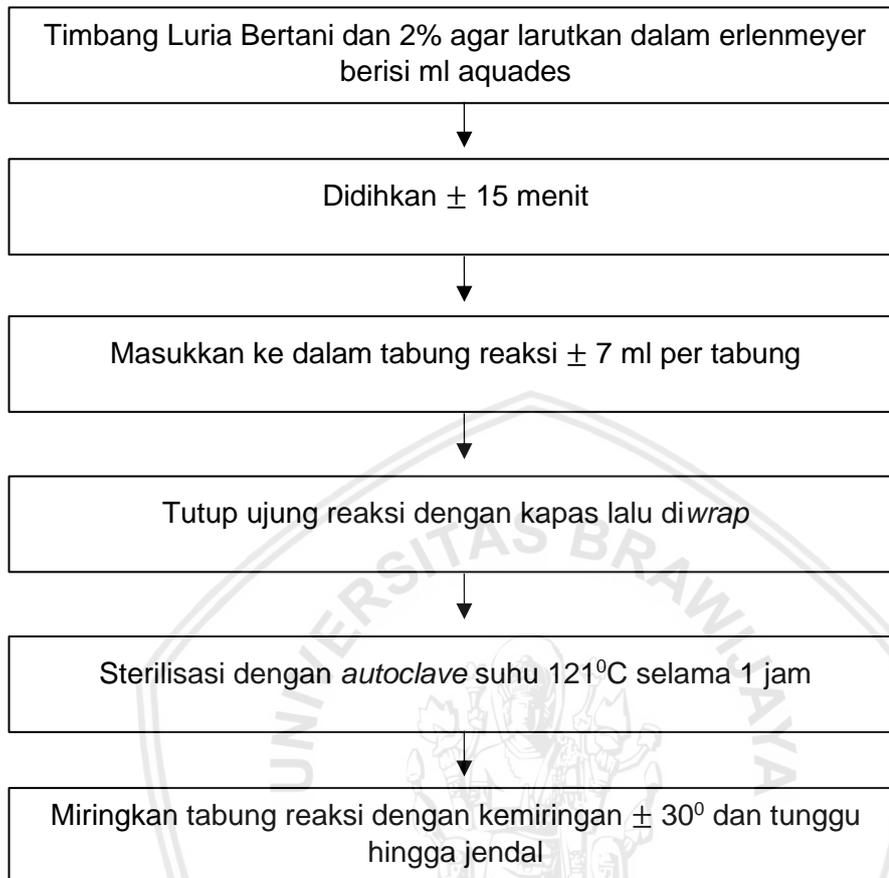
- Udhayashree, N., S. Duraisamy, S. Balakrishnan, Nithya, Kanagaraj dan G. Ramasamy. 2012. Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*. 406–410.
- Winarno, F. G. 2010. Enzim Pangan. *M-Bio Press*. Bogor. 166 hlm.
- Wuryanti. 2004. Isolasi dan penentuan aktivitas spesifik enzim bromelin dari buah nanas (*Ananas comosus L.*). *J. Kim. Sains & Apl.* **7** (3) : 78-82.
- Yamin, M., N. N. Palinggi dan Rachmansyah. 2008. Aktivitas enzim protease dalam lambung dan usus ikan kerapu macan setelah pemberian pakan. *Media Akuakultur*. **3** (1) : 40-45.
- Yempita, E., Yusra dan V. O. Efendi. 2017. Optimasi potensi bakteri *Bacillus subtilis* sebagai sumber enzim protease. *Jurnal Akuatika Indonesia*. **2** (1): 87-94.
- Yuarni, D., Kadirman dan Jamaluddin. 2015. Laju perubahan kadar air, kadar protein dan uji organoleptik ikan lele asin menggunakan alat pengering kabinet (*cabinet dryer*) dengan suhu terkontrol. *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian*. **1**: 12-21.
- Yuniati, R., T. T Nugroho dan F. Puspita. 2015. Uji aktivitas enzim protease dari isolat *bacillus* sp. Galur lokal riau. *Jom FMIPA*. **1** (2): 116-122.
- Yusriah dan N. D Kuswytasari. 2013. Pengaruh ph dan suhu terhadap aktivitas protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. **2** (1) :48-50.
- Zusfahair, P. Lestari dan A. Asnani. 2011. Isolasi dan karakterisasi protease alkalin dari isolat bakteri limbah ternak di *exfarm* Fakultas Peternakan Unsoed. *Molekul*. **6** (1): 46 – 56.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan *Skim Milk Agar*

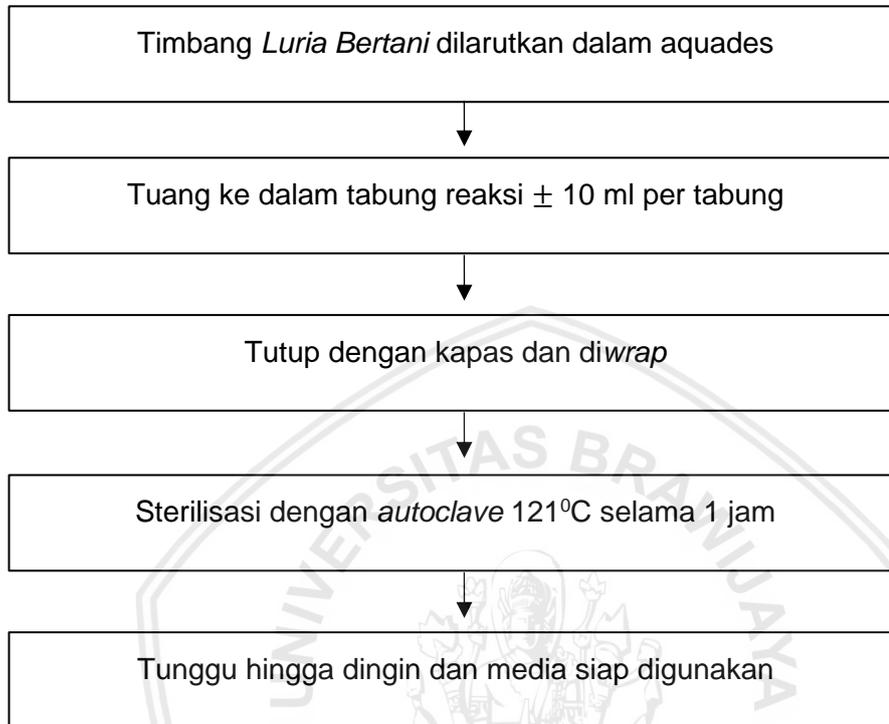
**Lampiran 2. Screening dan Isolasi Bakteri**



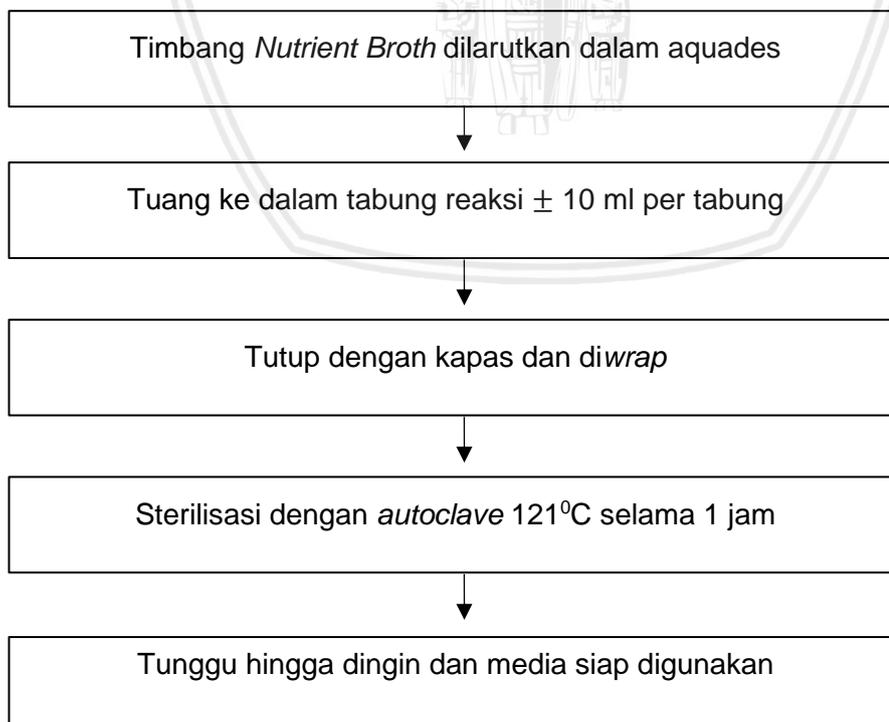
**Lampiran 3. Pembuatan *Luria Bertani* Agar**

#### Lampiran 4. Pembuatan Media Kultur

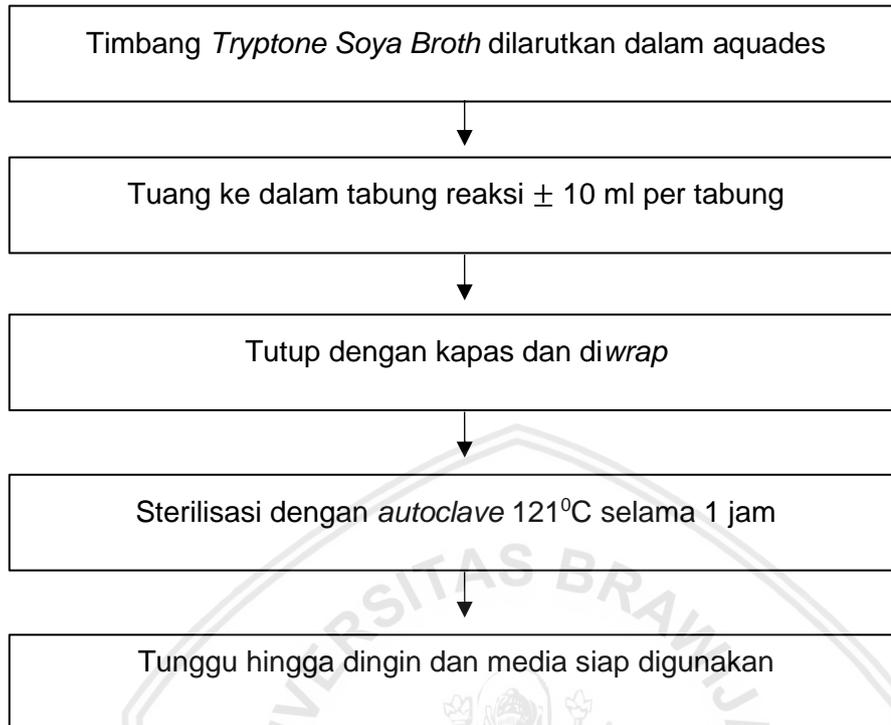
- *Luria Bertani Broth*



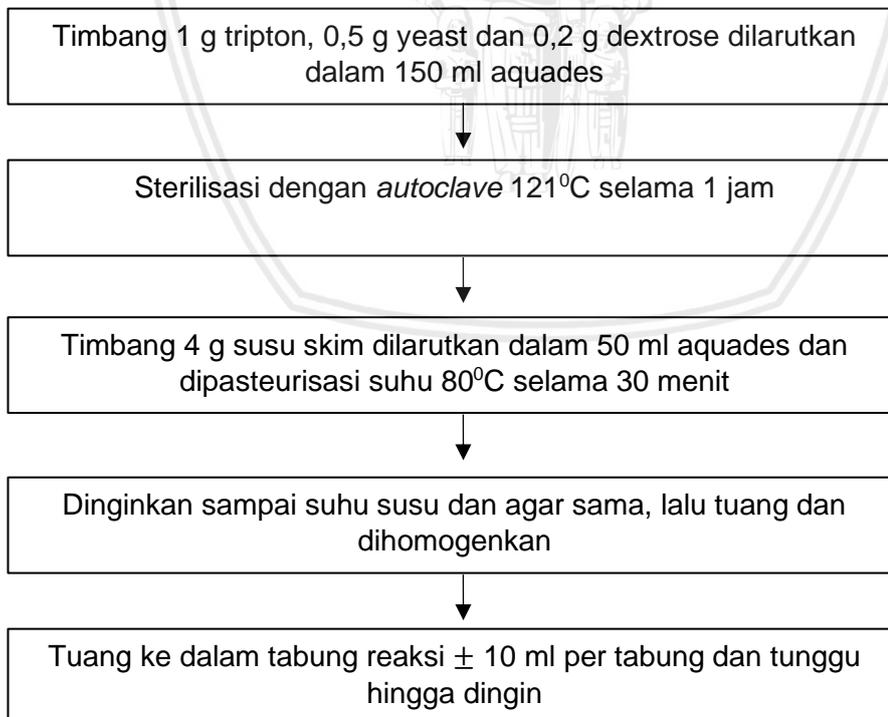
- *Nutrient Broth*

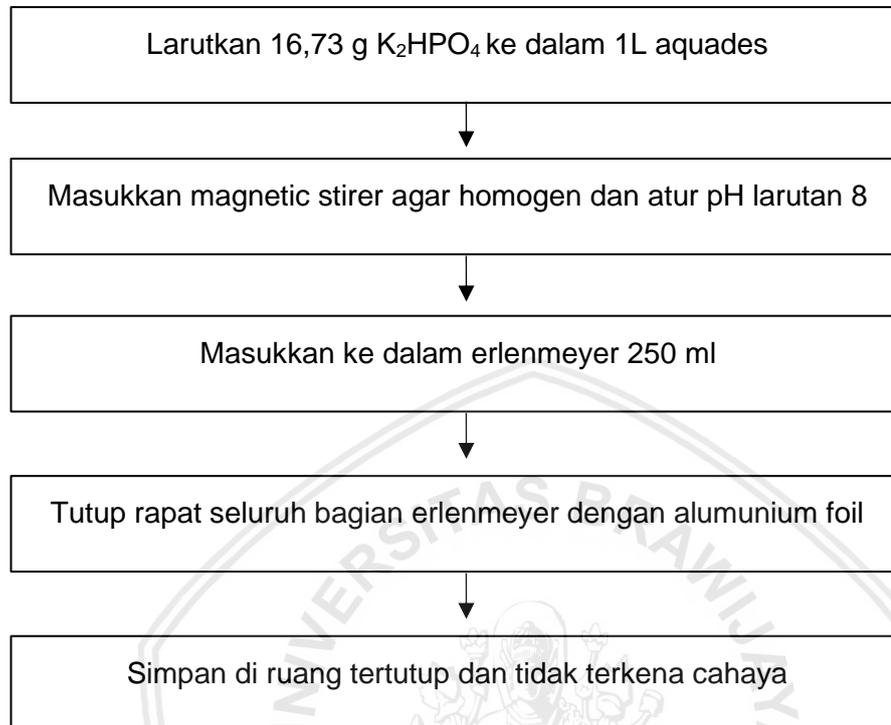


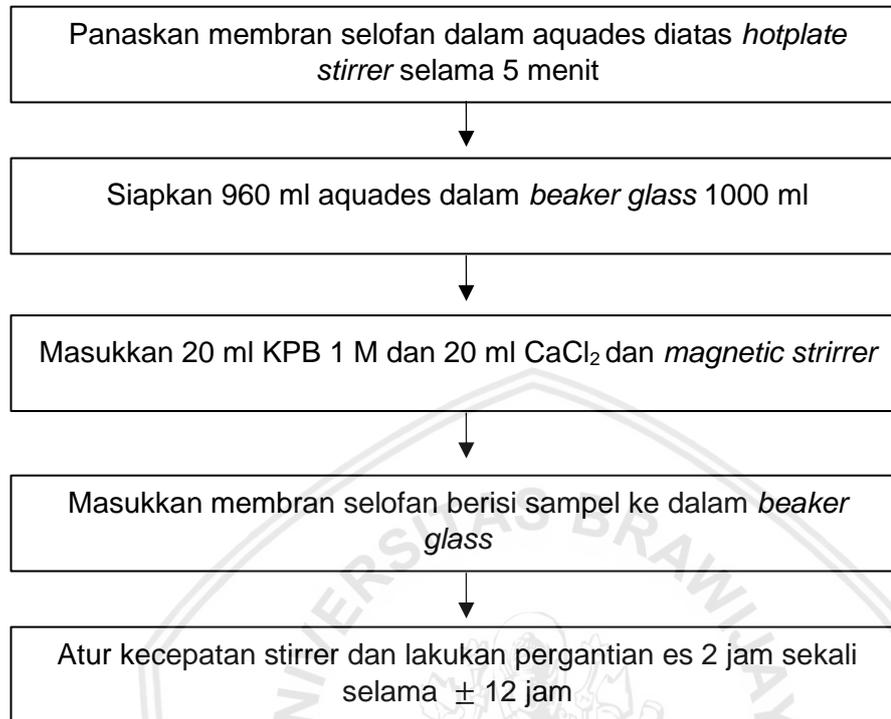
- *Tryptone Soya Broth*



- *Skim Milk Broth*



**Lampiran 5. Pembuatan KPB 1 M**

**Lampiran 6. Dialisis**

Lampiran 7. Hasil Analisis Indeks Proteolitik

**Descriptive**

Indeks Proteolitik

	N	Mean	Std. Deviation
1	5	1.5600	.13323
2	5	2.0760	.40402
3	5	1.9420	.82381
4	4	1.8225	.82083
Total	19	1.8516	.58600
Model			.60332
Fixed Effects			
Random Effects			

**ANOVA**

Indeks Proteolitik

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.721	3	.240	.660	.589
Within Groups	5.460	15	.364		
Total	6.181	18			

**DUNCAN**

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha =
		0.05
		1
1	5	1.5600
4	4	1.8225
3	5	1.9420
2	5	2.0760
Sig.		.245

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 8. Hasil Uji Kualitatif Enzim Proteolitik

ISOLAT 1	Ulangan	IU (U/ml)	RATA RATA ULANGAN	ST. DEVIASI
L	1	22,160	22,69	0,67
	2	21,830		
	3	22,928		
	4	23,477		
	5	23,038		
N	1	31,270	30,87	0,71
	2	30,501		
	3	30,391		
	4	31,928		
	5	30,282		
T	1	43,013	42,05	0,67
	2	41,916		
	3	41,696		
	4	41,257		
	5	42,355		
S	1	50,916	50,54	0,83
	2	49,270		
	3	50,806		
	4	51,465		
	5	50,257		

**Lampiran 9. Hasil Uji Kadar Protein**

ISOLAT 1	Ulangan	PROTEIN (mg/ml)	RATA- RATA	ST. DEVIASI
L	1	2,31	2,33	0,03
	2	2,31		
	3	2,33		
	4	2,37		
	5	2,35		
N	1	2,97	2,92	0,07
	2	2,91		
	3	2,83		
	4	3,01		
	5	2,87		
T	1	4,89	4,80	0,07
	2	4,79		
	3	4,77		
	4	4,71		
	5	4,85		
S	1	4,91	4,85	0,10
	2	4,70		
	3	4,89		
	4	4,95		
	5	4,81		

## Lampiran 10. Hasil Uji Kuantitatif Aktifitas Spesifik

KODE	Aktivitas Proteolitik	Rata-rata Aktivitas Proteolitik	Kadar Protein	Rata-rata Protein	Aktivitas Spesifik	Rata-rata Aktivitas Spesifik	ST. DEVIASI	
L	1	13,830	0,37		37,38			
	2	13,500	0,37		36,49			
	3	14,598	14,357	0,39	0,394	37,43	36,479	0,96
	4	15,147		0,43		35,23		
	5	14,708		0,41		35,87		
N	1	17,781	0,98		18,14			
	2	17,012	0,92		18,49			
	3	16,902	17,385	0,84	0,928	20,12	18,783	0,85
	4	18,439		1,02		18,08		
	5	16,793		0,88		19,08		
T	1	29,086	1,26		23,08			
	2	27,988	1,16		24,13			
	3	27,768	28,119	1,14	1,172	24,36	24,035	0,89
	4	27,329		1,08		25,30		
	5	28,427		1,22		23,30		
S	1	18,659	1,20		15,55			
	2	17,013	0,99		17,18			
	3	18,549	18,286	1,18	1,142	15,72	16,061	0,72
	4	19,208		1,24		15,49		
	5	18,000		1,10		16,36		

**Lampiran 11.** Hasil Analisis Aktivitas Proteolitik

**Descriptive**

Aktivitas Proteolitik

	N	Mean	Std. Deviation
1	5	14.3566	.67408
2	5	17.3854	.70545
3	5	28.1194	.66942
4	5	18.2858	.83077
Total	20	19.5368	5.34005
Model			.72290
Fixed Effects			
Random Effects			

**ANOVA**

Aktivitas Proteolitik

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	533.445	3	177.815	340.260	.000
Within Groups	8.361	16	.523		
Total	541.806	19			

**DUNCAN**

Aktivitas Proteolitik

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	5	14.3566		
2	5		17.3854	
4	5		18.2858	
3	5			28.1194
Sig.		1.000	.066	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 12. Hasil Analisis Kadar Protein

**Descriptive**

Kadar Protein

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
1	5	.3940	.02608	.01166
2	5	.9280	.07294	.03262
3	5	1.1720	.07014	.03137
4	5	1.1420	.09910	.04432
Total	20	.9090	.32672	.07306
Model			.07201	.01610
Fixed Effects				
Random Effects				.18006

**ANOVA**

Kadar Protein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.945	3	.648	125.054	.000
Within Groups	.083	16	.005		
Total	2.028	19			

**DUNCAN**

Kadar Protein

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	5	.3940		
2	5		.9280	
4	5			1.1420
3	5			1.1720
Sig.		1.000	1.000	.519

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 13. Hasil Analisis Aktivitas Spesifik

**Descriptive**

Aktivitas Spesifik

	N	Mean	Std. Deviation
1	5	36.4800	.95488
2	5	18.7820	.84695
3	5	24.0340	.88982
4	5	16.0600	.71502
Total	20	23.8390	8.08287
Model			.85618
Fixed Effects			
Random Effects			

**ANOVA**

Aktivitas Spesifik

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1229.595	3	409.865	559.132	.000
Within Groups	11.729	16	.733		
Total	1241.324	19			

**DUNCAN**

Aktivitas Spesifik

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4	5	16.0600			
2	5		18.7820		
3	5			24.0340	
1	5				36.4800
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 14.** Proses Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Proteolitik dari Limbah Saluran Pencernaan Ikan Lele (*Clarias* sp.)

