

**PENGARUH SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE *Bacillus subtilis* DARI DAUN KENIKIR (*Cosmos sulphureus*)
YANG DITUMBUHKAN DALAM MEDIA CAMPURAN
LIMBAH CAIR TAHU DAN DEDAK**

SKRIPSI

Oleh:

MAMLUATUL FAIZAH

NIM. 13620101



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**PENGARUH SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE *Bacillus subtilis* DARI DAUN KENIKIR (*Cosmos sulphureus*)
YANG DITUMBUHKAN DALAM MEDIA CAMPURAN
LIMBAH CAIR TAHU DAN DEDAK**

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

untuk Memenuhi Salah satu Persyaratan dalam

Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh:

MAMLUATUL FAIZAH

NIM. 13620101

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

HALAMAN PERSETUJUAN

PENGARUH SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE *Bacillus subtilis* DARI DAUN KENIKIR (*Cosmos sulphureus*)
YANG DITUMBUHKAN DALAM MEDIA CAMPURAN
LIMBAH CAIR TAHU DAN DEDAK

SKRIPSI

Oleh:
MAMLUATUL FAIZAH
NIM. 13620101

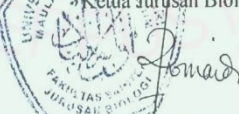
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 40 Desember 2017

Pembimbing I,


Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509199903 2 002

Pembimbing II,


Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIDT. 1986 05122016 08011060

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaid, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

**PENGARUH SUHU DAN pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE
Bacillus subtilis DARI DAUN KENIKIR (*Cosmos sulphureus*) YANG
DITUMBUHKAN DALAM MEDIA CAMPURAN
LIMBAH CAIR TAHU DAN DEDAK**

SKRIPSI

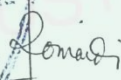
Oleh:
MAMLUATUL FAIZAH
NIM. 13620101

Telah Dipertahankan di Depan Penguji Skripsi
dan dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal 3 Januari 2018

Penguji Utama	<u>Ir. Liliek Haranie Ar. M.P</u> NIP. 19620901 199803 2 001	
Ketua Penguji	<u>Nur Kusmiyati, M.Si</u> NIDT. 19890816 20160801 2 061	
Sekretaris Penguji	<u>Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si</u> NIP. 19650509 1999903 2 002	
Anggota Penguji	<u>Mujahidin Ahmad, M.Sc</u> NIDT. 1986 05122016 08011060	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi


Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mamluatul Faizah

NIM : 13620101

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease *Bacillus Subtilis* dari Daun Kenikir (*Cosmos Sulphureus*) yang Ditumbuhkan dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar rujukan. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 3 Januari 2018

Yang membuat pernyataan,



Mamluatul Faizah
NIM. 13620101

MOTTO

لَا تَحْتَقِرْ مَنْ دُونَكَ فَلِكُلِّ شَيْءٍ مَرِيَّةٌ

“Jangan menghina seseorang yang lebih rendah daripada kamu, karena segala sesuatu itu mempunyai kelebihan atau keistimewaan”



PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Karya sederhana ini penulis persembahkan kepada:

Kedua orang tua saya, Mamak Maslaha dan Alm. Abah H. Masduki Ismail yang senantiasa memberi dukungan dalam bentuk ridho, do'a, kasih sayang, materi dan segala bentuk dukungan lainnya. I Love U mamak and Abah.

Abi H. Mastur dan mbak Hj. Mil sebagai kakak sekaligus orang tua kedua saya yang selalu memberikan segala macam dukungan yang luar biasa.

Saudara-saudara saya, Mbak Zizah dan mbak Ain yang selalu mendengarkan celotehan adek kecilnya ini dan selalu menasehati untuk kebaikan.

Sahabat-sahabat saya the Coro's family (Terry, Citul, Ami, Ubed gembrot, Putro, Bang Je, Dek faiz, Ari, dan kak Bintang) dan sahabat-sahabat saya yang lain atas dukungan, do'a, bantuan, dan nasehat kalian yang sangat luar biasa.

Dan semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur *Alhamdulillah* kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq, hidayah, dan kasih sayang-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease *Bacillus subtilis* dari Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) yang Ditumbuhkan dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak”. Sholawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada baginda kita Nabi Muhammad SAW, sang revolusioner Islam yang telah mengajak manusia dari kedholiman menuju keadilan dan mengeluarkan manusia dari zaman kegelapan menuju zaman yang terang benderang yakni *ad-din al-Islam*. Penyusunan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terimakasih seiring doa penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si, D.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr.Hj. Ulfah Utami, M.Si dan Mughaidin Ahmad, M.Sc., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran dan keikhlasan telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau beserta keluarganya. Amiin.
5. Ir. Liliek Harianie A.R, M.P dan Nur Kusmiyati, M. Si, selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang membantu terselesaikannya skripsi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau beserta keluarganya. Amiin.
6. Berry Fakhry Hanifa, S. Si., M. Sc, selaku dosen wali yang telah memberikan dukungan serta do'a sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau beserta keluarganya. Amiin.

7. Seluruh Dosen, Laboran Jurusan Biologi, dan Staf Administrasi yang telah banyak membantu dan memberikan ilmu yang bermanfaat.
8. Malaikat hatiku Mamak Maslaha dan Alm. Abah H. Masduki, serta anggota keluarga lain yang selalu ada dan selalu memberikan do'a, serta dukungan yang sangat luar biasa.
9. Teman-teman seperjuangan Biologi 2013 yang selalu memberikan semangat dan dukungan.
10. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril.

Penulis mengakui bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna karna masih banyak kekurangan didalamnya. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun, guna perbaikan ke depannya. Penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin yarobbal Alamin.*

Wassalamu 'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Malang, 3 Januari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
المخلص	xvii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian	10
1.4 Hipotesis	10
1.5 Manfaat Penelitian	10
1.6 Batasan Masalah	11
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Enzim Protease	12
2.2 Aplikasi Enzim Protease	22
2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	24
2.4 Faktor Yang Mempengaruhi Kerja Enzim	28
2.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri	32
2.6 Limbah Cair Tahu	36
2.7 Dedak	40
2.8 Pengujian Aktivitas Protease.....	41
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Penelitian	44
3.2 Waktu dan Tempat	45
3.3 Variabel Penelitian	45

3.3.1 Variabel Bebas	45
3.3.2 Variabel Terikat	45
3.4 Alat dan Bahan	46
3.5 Prosedur Penelitian	46
3.5.1 Pembuatan Media	46
3.5.1.1 Media Agar Nutrient	46
3.5.1.2 Media Produksi Protease	47
3.5.2 Peremajaan <i>Bacillus subtilis</i>	47
3.5.3 Uji Kualitatif Protease	47
3.5.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	48
3.5.5 Produksi Enzim Protease.....	48
3.5.6 Pengukuran Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	48
3.5.7 Analisa Data	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Uji Aktivitas Enzim Protease yang Dihasilkan <i>Bacillus subtilis</i> secara Kualitatif.....	51
4.2 Pola Pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>	52
4.3 Pengaruh Interaksi Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	55
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	66
5.2 Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	77

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Suhu dan pH	44
Tabel 4.1 Uji DMRT Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Protease	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Proses Sintesis Enzim Protease	13
Gambar 2.2 Mekanisme Umum Hidrolisis Enzimatik Substrat Peptida	15
Gambar 2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	27
Gambar 2.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri	35
Gambar 2.5 Struktur Kasein	42
Gambar 4.1 Petri dengan Media SMA menunjukkan zona bening yang dihasilkan dari aktivitas enzim protease bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	51
Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dalam Media Campuran Limbah Cair tahu dan Dedak	53
Gambar 4.3 Grafik Pengaruh Interaksi Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease dari <i>Bacillus subtilis</i> yang Ditumbuhkan dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak	58

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Pereaksi Aktivitas Enzim Protease Metode Bergmeyer (1983).....	77
Lampiran 2. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Protease	80
Lampiran 3. Analisis Data	82
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian	84



ABSTRAK

Faizah, Mamluatul. 2017. **Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease *Bacillus subtilis* dari Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) yang Ditumbuhkan dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak**. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Dosen Pembimbing (I) Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si. (II) Mujahidin Ahmad, M.Sc

Kata Kunci : Suhu, pH, Enzim Protease, *Bacillus subtilis*

Protease merupakan salah satu enzim yang menempati posisi penting dalam bidang industri enzim. Protease adalah enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis protein menjadi asam amino dan peptida sederhana. Enzim ini dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti tanaman, hewan, dan mikroba. *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan enzim protease yang dapat menghidrolisis protein. Campuran limbah cair tahu dan dedak dapat dimanfaatkan sebagai media produksi enzim protease dari *Bacillus subtilis*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* dari Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak.

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor dan masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Faktor pertama adalah variasi suhu 25 °C, 35 °C, 45 °C, dan 55 °C, sedangkan faktor kedua adalah variasi pH 7, 8, dan 9. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA) dan apabila terdapat pengaruh nyata terhadap parameter maka dilakukan uji lanjut dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kesalahan 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu dan pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* dari Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak. Aktivitas protease tertinggi diperoleh pada perlakuan interaksi suhu 55 °C dan pH 8 sebesar 1,511 U/ml, sedangkan aktivitas protease terendah diperoleh pada perlakuan interaksi suhu 25 °C dan pH 7 sebesar 0,063 U/ml.

ABSTRACT

Faizah, Mamluatul. 2017. **The Effect of Temperature dan pH on Protease Enzyme Activity Against *Bacillus subtilis* from Kenikir Leaf (*Cosmos sulphureus*) Grown in Mixed Waste Liquid Media of Tofu and Bran.** Biology Department of Science and Technolgy Faculty State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor: (I) Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si. (II) Mujahidin Ahmad, M.Sc

Keywords: *Temperature, pH, Protease Enzyme, Bacillus subtilis*

Protease is one of the enzymes that occupy an important position in industrial enzymes. Extracellular protease is an enzyme which can hydrolyze peptide bonds of proteins into amino acids and oligopeptides. This enzyme can be isolated from plants, animals, and microbes. *Bacillus subtilis* can produce protease enzyme with an index of 1,44. Mixed liquid waste of tofu and bran can be utilized as a medium production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. The aims of this research was to determine the effects of temperature and pH on the protease enzyme activity of *Bacillus subtilis* from Kenikir Leaf (*Cosmos sulphureus*) that grown in Mixed Waste Liquid Media of Tofu and Bran.

This research is experimentally uses a Completely Randomized Design (CRD) factorial design with two factor treatments and 3 times repetition. The first factor is variation of temperature which are 25 °C, 35 °C, 45 °C, and 55 °C. the second is variation of pH which are pH 7, 8, and 9. The data were analyzed using Analysis Of Variance (ANOVA) and if the data significantly affected the parameter, then it would be continued by Duncan Multiple Range test (DMRT) with the fault level 5%.

The result showed that the interaction of temperature and pH affected the protease enzyme activity of *Bacillus subtilis* from Kenikir Leaf (*Cosmos sulphureus*) that grown in Mixed Waste Liquid Media of Tofu and Bran. The highest protease enzyme activity obtained from interaction of temperature 55 °C and pH 8 with an activity of 1,511 U/ml, while the lowest protease enzyme activity obtained from interaction temperature 25 °C and pH 7 with an activity of 0,063 U/ml.

مستخلص البحث

الفائزة، مملوثة. 2017. تأثير درجة الحرارة و pH إلى نشاط أنزيم البروتيني *Bacillus subtilis* من ورقة كنيكر (*Cosmos sulphureus*) ناضج في وسائل الإعلام المختلطة السائل التوفو النفايات و النخالة. البحث الجامعي. قسم الحياة كليت العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشريف: ولفة وتم الماجستير، مجاحدين أحمد الماجستير.

الكلمات الأساسية: درجة الحرارة، pH، أنزيم البروتيني، *Bacillus subtilis*

البروتيني هو واحد من أنزيم الذي تحتل مكانة هامة في مجال الانزيمات الصناعية، البروتيني هو إنزيمات خارج الخلية التي يمكن لتحلل بروتيني في الأحماض الأمينية و البيتيدي بسيطة. هذا أنزيم يمكن ليعاد من مصادر مختلفة من النباتات، حيوان، و ميكروب. *Bacillus subtilis* قادرة على إنتاج الإنزيمات البروتياز التي يمكن بروتين الكولسترول. مختلطة السائل التوفو النفايات و نخالة يمكن استخدامها ليكون وسائل الإعلام إنتاج الأنزيمات البروتينية من *Bacillus subtilis*. كان هذه الباحثة لتعريف تأثير درجة الحرارة و pH ضد نشاط أنزيم الأنزيم البروتيني *Bacillus subtilis* من ورقة كنيكر (*Cosmos sulphureus*) ناضج في وسائل الإعلام المختلطة السائل التوفو النفايات و النخالة.

كان طبيعة هذه البحث تجريبي بتصميم عشوائي كامل (RAL) نمط عاملي باثنين من العوامل و كل عامل وكرر ثلاث مرات. العامل الأول هي متنوعة درجة الحرارة 25 °C, 35 °C, 45 °C, و 55 °C, عما عوامل اثاني هي متنوعة pH 7, 8, و 9 يتم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها بطريقة *Analysis Of Variance* (ANOVA) و إذا تأثير حقيقي للمعلمة ثم اختبارها أبعد من ذلك بإختبار *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) على مستوى الخطأ 5%.

نتيجة من هذه البحث أن درجة الحرارة و pH يتأثر ل نشاط أنزيم البروتيني *Bacillus subtilis* من ورقة كنيكر (*Cosmos sulphureus*) ناضج في وسائل الإعلام المختلطة السائل التوفو النفايات و النخالة. تم الحصول على أعلى نشاط للبروتياز في علاج تفاعل درجة الحرارة 55 °C و pH 8 كبير مثل 1,511 U/ml, بينما تم الحصول على أقل نشاط للبروتياز في علاج تفاعل درجة الحرارة 25 °C و pH 7 كبير مثل 0,063 U/ml.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai biokatalisator pada reaksi-reaksi biokimia (Lehninger, 1997). Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak beracun (Yuneta dan Putra, 2010). Kemajuan aplikasi enzim dalam bidang teknologi menyebabkan penggunaan enzim dalam bidang industri baik pangan maupun non pangan semakin meningkat (Ward, 1985). Beberapa pengamatan yang telah dilakukan membuktikan bahwa penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun mencapai 10-15% (Mufarrikha, *et al.*, 2014).

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri (Suhartono, 1992). Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisika-kimia dan sifat-sifat katalitik yang sangat bervariasi (Ward, 1983). Protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein (Poliana, 2007). Enzim ini dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme dan mempunyai peranan yang sangat penting dalam metabolisme sel dan keteraturan dalam sel (Ward, 1983). Protease ekstraselular adalah enzim yang

dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Bergmann, 1942).

Penggunaan enzim protease sangat efektif dan menguntungkan. Dalam industri pangan, enzim protease dimanfaatkan untuk pengolahan susu, roti, biskuit, proses pematangan keju, pengempukan daging, dan pembuatan produk dari kedelai. Selain itu enzim protease juga digunakan pada beberapa aplikasi industri seperti deterjen, farmasi, produk-produk kulit, produk-produk makanan, dan proses pengolahan limbah industri (Kurniawati, 2012).

Perdagangan protease mencapai 60% dari total penjualan enzim dunia yang mencapai 2 miliar US\$ dengan peningkatan nilai jual mencapai 6-7% pertahun (Suhartono, 2000), khususnya protease mikroba mencapai 40% dari total jumlah enzim yang di jual di seluruh dunia (Gupta, *et al.*, 2002). Kebutuhan enzim protease sangat tinggi, tetapi pemenuhan kebutuhan terhadap enzim protease hampir 100% masih bergantung pada produk impor (Kurniawati, 2012). Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut adalah dengan mengupayakan untuk memproduksi enzim protease dengan mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya hayati yang dimiliki oleh Indonesia (Suhartono, 2000).

Keragaman hayati Indonesia yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim protease (Akhdiya, 2003). Keberadaan mikroorganisme secara implisit dapat dikaitkan dalam Al-Qur'an Surat Yunus (10) ayat 61 yang berbunyi:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya: “Kamu tidak berada dalam suatu Keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al-Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarrah (atom) di bumi ataupun di langit. tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)”.

Bahreisy (1988) menjelaskan dalam *Tafsir Ibnu Katsir*, bahwa Allah mengetahui tentang semua makhluk-Nya. Tidak ada sesuatu walaupun seberat zarrah atau lebih kecil dari itu yang luput dari jangkauan pengetahuan-Nya.

Maksud dari kata *dzarrah* (atom) dalam ayat tersebut adalah segala sesuatu yang ada di bumi ini yang diciptakan Allah dengan ukuran kecil (atom), termasuk di dalamnya benda hidup yang memiliki ukuran sangat kecil yaitu bakteri yang tidak luput dari jangkauan pengetahuan Allah. Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim (Kosim, 2010). Beberapa mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim protease diantaranya adalah bakteri dari genus *Bacillus* dan kapang dari genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Endhotia*, dan *Mucor* (Yusriah dan Nengah, 2013).

Sebagian besar genus *Bacillus* merupakan produsen utama protease ekstraseluler (Nascimento dan Martins, 2006). Mikroba jenis *Bacillus* tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstrasel membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri (Doi, 1992). Salah satunya adalah spesies *Bacillus subtilis* (Soeka dan Sulistiani, 2014).

Bacillus subtilis banyak digunakan dalam sektor industri enzim (Chu, 2007). *Bacillus subtilis* sangat direkomendasikan untuk produksi protease dalam skala besar di sektor industri (Pant, *et al.*, 2015). *Bacillus subtilis* yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri endofit yang telah diisolasi oleh Wibawani (2016) dari daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*). Bakteri endofit mempunyai peluang yang sama dengan bakteri yang hidup diluar jaringan tanaman sebagai bakteri potensial (Melliawati, *et al.*, 2016). Bakteri endofit *Bacillus* memiliki potensi dalam menghasilkan enzim protease, amylase, dan lipase (Fatichah, 2011).

Melliawati, *et al.*, 2016 menyebutkan bahwa bakteri endofit *Bacillus amyloliquefaciens* subs. *Plantarum* strain FZB42 yang diisolasi dari Taman Nasional Gunung Halimun dapat menghasilkan enzim protease sebesar 125,204 U/ml. Dalam penelitian Fatichah (2011) disebutkan bahwa bakteri endofit *Bacillus mycoides* yang diisolasi dari akar tanaman kentang berpotensi sebagai penghasil enzim protease dengan nilai indeks protease sebesar 1,79. Setelah dilakukan penelitian lanjutan oleh Noviasari (2013), aktivitas protease meningkat dengan interaksi suhu 60°C dan pH 8 yaitu sebesar $27,59 \times 10^{-2}$ U/ml pada media

campuran limbah cair tahu dan dedak. Protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit memainkan peranan penting pada proses penetrasi dan migrasi ke jaringan inang definitif (Ummulbalqis, 2006).

Dewasa ini, para ilmuwan mulai memanfaatkan limbah sebagai substrat potensial penghasil protease (Yun, 2006). Salah satu jenis limbah yang dapat digunakan adalah limbah cair tahu yang tidak dimanfaatkan kembali dan pada umumnya dibuang di sungai, yang dapat mengakibatkan pencemaran sungai (Pandy, 2010). Di Indonesia, produksi limbah cair tahu dari industri tahu mencapai 20 juta meter kubik per tahun dan menghasilkan emisi sekitar 1 juta ton CO₂ ekuivalen. Sebanyak 80% industri tahu berada di Pulau Jawa. Dengan demikian, emisi yang dikeluarkan pabrik tahu di Jawa mencapai 0,8 juta ton CO₂ ekuivalen (Setiawan dan Rusdijati, 2014). Limbah cair tahu mengandung 40-60% protein, 25-50% karbohidrat, dan 10% lemak (Sugiharto, 1994). Komponen nutrisi lengkap dari limbah cair tahu yang masih mengandung protein dengan kadar tinggi memungkinkan mikroorganisme penghasil protease dapat tumbuh di dalamnya.

Berdasarkan penelitian Naiola dan Widhyastuti (2002), dilaporkan bahwa *Bacillus macerans* memiliki aktivitas protease lebih tinggi dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak dibandingkan dengan media limbah cair tahu tanpa campuran dedak yakni sebesar $17,61 \times 10^{-2}$ U/ml. Adapun besarnya aktivitas protease *Bacillus macerans* dalam media limbah cair tahu tanpa dedak yaitu $1,67 \times 10^{-2}$ U/ml, sedangkan dalam media dedak saja sebesar $13,26 \times 10^{-2}$ U/ml. Mufarrihah (2009) menyatakan bahwa dedak mempunyai komposisi sebagai berikut: abu 7,7-20,6%, protein 9,8-15,4%, selulosa 5,0-12,3%, serat kasar 5,7-

20,9%, nitrogen 34,2-46,1%, pentosa 8,7,1-11,14%, lemak 7,7-11,4%, kadar air 8,4-14,7,9%. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian aktivitas enzim protease bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang berasal dari tanaman Kenikir dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak sehingga diharapkan dapat meningkatkan produksi enzim protease.

Media produksi untuk menghasilkan enzim harus memenuhi kebutuhan dasar untuk menghasilkan sel serta produk. Unsur utama yang paling dibutuhkan adalah nitrogen dan karbon. Nitrogen sangat diperlukan untuk pertumbuhan sel, sedang unsur karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis (Aunstrup, 1979). Selain kandungan protein dalam limbah cair tahu, dedak juga mengandung protein dan nitrogen yang relatif tinggi (Udiyono, 1987). Mufidah (2015) menambahkan bahwa dedak padi merupakan sumber karbohidrat yang mengandung banyak unsur karbon (C) dan nitrogen (N) yang dapat digunakan sebagai tambahan nutrisi pada media produksi. Diantara media produksi yang belum banyak dimanfaatkan adalah limbah yang jika tidak diolah akan merusak lingkungan. Padahal islam mewanti-wanti pada umatnya untuk tidak melakukan kerusakan di muka bumi. Sebagaimana diterangkan dalam Al-Quran surat Al-A'raaf (7) ayat 56 yang berbunyi:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

Artinya: *“Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah Amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik”* (Al-A'raaf (7) : 56).

Menurut tafsir Ibnu Katsir (2003) bahwa Allah melarang hal-hal yang membuat kerusakan di muka bumi dan memerintahkan hamba-hamba-Nya untuk beribadah, berdoa, dan merendahkan diri kepada-Nya.

Maksud dari penggalan ayat “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya” adalah Allah melarang segala perbuatan yang menimbulkan kerusakan di bumi dan hal-hal yang membahayakan kelestariannya sesudah diperbaiki. Oleh sebab itu, manusia diperintahkan untuk mengelola alam dengan cara melestarikannya dan mengurangi dampak dari limbah yang dihasilkan.

Berbagai manfaat di dalam alam semesta yang belum dimanfaatkan secara maksimal baiknya sebagai umat manusia yang diberi akal pikiran harus mampu memanfaatkan dan mengelola apa yang telah di berikan oleh Allah dengan sebaik-baiknya, seperti halnya limbah cair tahu dan dedak sebagai media produksi enzim protease. Sehingga, limbah ini tidak terbuang sia-sia. Segala ciptaan Allah SWT di muka bumi ini tidak ada satupun yang sia-sia. Sebagaimana dicantumkan dalam Al-Qur'an surat Ali 'Imron (3) ayat 191 yang berbunyi:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan Ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka.”. (Ali 'Imron (3) : 191)

Berdasarkan ayat yang bergaris bawah di atas, bermakna bahwa diantara perkataan yang diucapkan oleh orang-orang berakal adalah mereka yang mensucikan Tuhan mereka, yaitu dengan mengatakan bahwa tidak mungkin Allah menciptakan langit dan bumi ini dengan sia-sia atau tanpa ada hikmah satu pun (Asy-Syanqithi, 2006).

Adanya limbah cair tahu dan dedak yang dapat digunakan sebagai media produksi enzim protease ini merupakan salah satu hikmah yang perlu diteliti. Sebagaimana yang diketahui bahwa sebagian besar pabrik produksi tahu membuang limbah dari produksi tahu ke saluran air tanpa memikirkan dampak yang akan terjadi. Sehingga, Allah memberikan akal kepada manusia untuk memikirkan suatu solusi. Salah satunya dengan memanfaatkan limbah cair tahu ini menjadi media produksi enzim protease.

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama adalah substrat, suhu, dan pH (tingkat keasaman). Tiap enzim memerlukan suhu dan pH optimum yang berbeda-beda karena enzim adalah protein yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan keasaman berubah. Di luar suhu dan pH yang sesuai, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan mengalami kerusakan (Ahira, 2011). Menurut Pratiwi (2008) faktor yang sangat diperhatikan pada enzim yang akan diaplikasikan dalam industri dan akan mempengaruhi kestabilannya ialah suhu dan pH. *Bacillus subtilis* yang diuji merupakan bakteri endofit. Adapun daun Kenikir berasal dari desa Ampeldento, Kecamatan Karangploso, Malang yang memiliki suhu berkisar 22°C hingga 28°C.

Penelitian potensi *Bacillus subtilis* dalam menghasilkan enzim protease telah banyak dilaporkan. Pant, *et al* (2015) menyatakan bahwa *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari tanah dapat memproduksi enzim protease tertinggi pada pH 7.4 sebanyak 143,3 U/ml dalam substrat gelatin. Soeka dan Sulistiani (2014) menyebutkan bahwa aktivitas tertinggi protease *Bacillus subtilis* A₁ InaCC B398 yang diisolasi dari terasi Samarinda sebesar 87,35 U/ml pada suhu 50°C dan pH 8,5. Dalam penelitian Nisha dan Divakaran (2014), produksi tertinggi enzim

protease *Bacillus subtilis* NS yang diisolasi dari air laut terdapat pada pH 9 (123,5 U/ml) dan pada suhu 40 °C (117,4 U/ml). Bakteri memiliki potensi yang lebih besar dalam memproduksi enzim protease dibandingkan dengan kapang. Hal ini dapat diketahui dari hasil aktivitas protease yang dihasilkan oleh *Penicillium* sp, *Verticillium* sp, dan *Trichoderma* sp yang diisolasi dari tanah Wonorejo berturut-turut adalah 0,197 U/ml, 0,196 U/ml, dan 0,162 U/ml (Yusriah dan Kuswytasari, 2013).

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, dapat diketahui bahwa walaupun spesies sama jika diisolasi dari tempat yang berbeda dalam substrat berbeda akan memiliki aktivitas protease optimum yang berbeda pula. Selain itu minimnya penelitian mengenai potensi bakteri endofit *Bacillus subtilis* menjadikan penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui potensi bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari daun Kenikir dalam menghasilkan enzim protease serta mengetahui suhu dan pH optimum terhadap aktivitas protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak. Hasil penelitian diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif untuk memproduksi enzim protease secara komersial serta menjadi solusi dalam mengurangi permasalahan limbah.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh interaksi suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh interaksi suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak.

1.4 Hipotesis

Adapun hipotesis dari penelitian ini adalah aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* tinggi pada suhu dan pH optimum.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi dan wawasan terhadap pengembangan ilmu pengetahuan biologi dan khususnya mata kuliah mikrobiologi dan bioteknologi.
2. Memberikan informasi mengenai potensi bakteri endofit *Bacillus subtilis* dalam menghasilkan enzim protease.
3. Memberikan informasi ilmiah mengenai media alternatif campuran limbah cair tahu dan dedak untuk memproduksi enzim protease *Bacillus subtilis*.
4. Memberikan informasi ilmiah mengenai suhu dan pH optimum untuk aktivitas enzim protease yang dihasilkan *Bacillus subtilis*.
5. Dapat dijadikan sumber informasi untuk penelitian selanjutnya, untuk mengembangkan bakteri *Bacillus subtilis* sebagai agen penghasil enzim protease yang lebih menguntungkan.

6. Dapat dijadikan solusi dalam mengurangi dampak pencemaran limbah cair tahu di lingkungan.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bakteri endofit yang digunakan yaitu *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari koleksi laboratorium mikrobiologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah diisolasi dari daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*).
2. Limbah cair tahu didapatkan dari rumah pembuatan tahu secara tradisional di kota Malang, sedangkan dedak didapat dari penggilingan beras di kota Malang.
3. Parameter yang dianalisa adalah aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* yang ditunjukkan dengan pengukuran nilai aktivitas enzim yang dihasilkan (U/ml).
4. Suhu yang digunakan adalah 25 °C, 35 °C, 45 °C, dan 55 °C, sedangkan pH yang digunakan adalah 7,8, dan 9.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

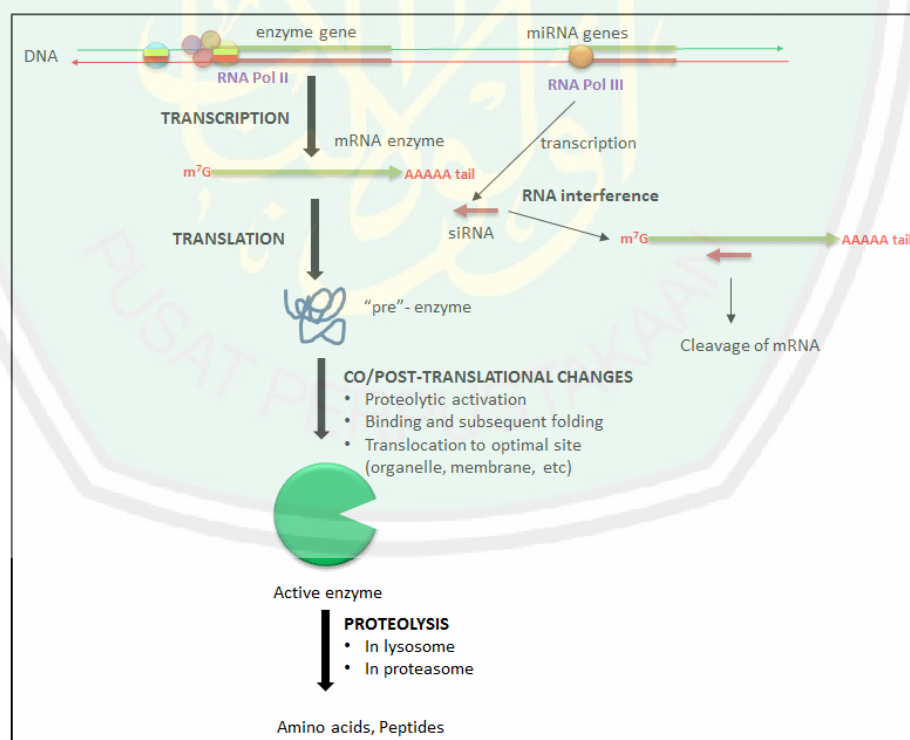
2.1 Enzim Protease

Enzim merupakan katalisator protein yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologi. Sebagai protein, enzim memiliki sifat-sifat umum protein, seperti enzim terdenaturasi pada suhu tinggi atau kondisi ekstrim lainnya. Beberapa oksidator, keadaan polaritas larutan, tekanan osmotik yang abnormal juga dapat menghambat kerja enzim (Suhartono, 1989).

Enzim memiliki beberapa kelebihan sebagai katalisator dibandingkan dengan bahan kimia lainnya, diantaranya yaitu (1) enzim memiliki spesifitas yang tinggi, (2) enzim hanya mengkatalis substrat tertentu, (3) tidak terbentuk produk sampingan (*by-product*) yang tidak diinginkan, (4) produktifitas yang tinggi sehingga dapat mengurangi biaya, (5) produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Sutandi, 2003). Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi dan industri kimia lainnya. Dalam bidang pangan misalnya amilase, invertase, glukosa-isomerase, papain, dan bromelin, sedangkan dalam bidang kesehatan contohnya amilase, lipase, dan protease. Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Boyer, 1971). Salah satu enzim yang berperan di dalam industri adalah enzim protease karena enzim ini banyak digunakan baik untuk pangan maupun non pangan (Pant., *et al*, 2015).

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang

melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisika-kimia dan sifat-sifat katalitik yang sangat bervariasi, enzim ini dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme dan mempunyai peranan yang sangat penting dalam metabolisme sel dan keteraturan dalam sel (Ward, 1983). Protease ekstraseluler sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme (Rao, *et al.*, 1998). Proses sintesis enzim ekstraseluler diatur oleh kinase 2 (ERK2); sebagai mitogen yang mengaktifasi protein kinase 2 (MAPK2) yang berperan dalam memberi sinyal sel di dalam membran sel (Jalubowski, 2017). Proses metabolik enzim protease secara umum ditunjukkan pada gambar 2.1 dibawah ini.



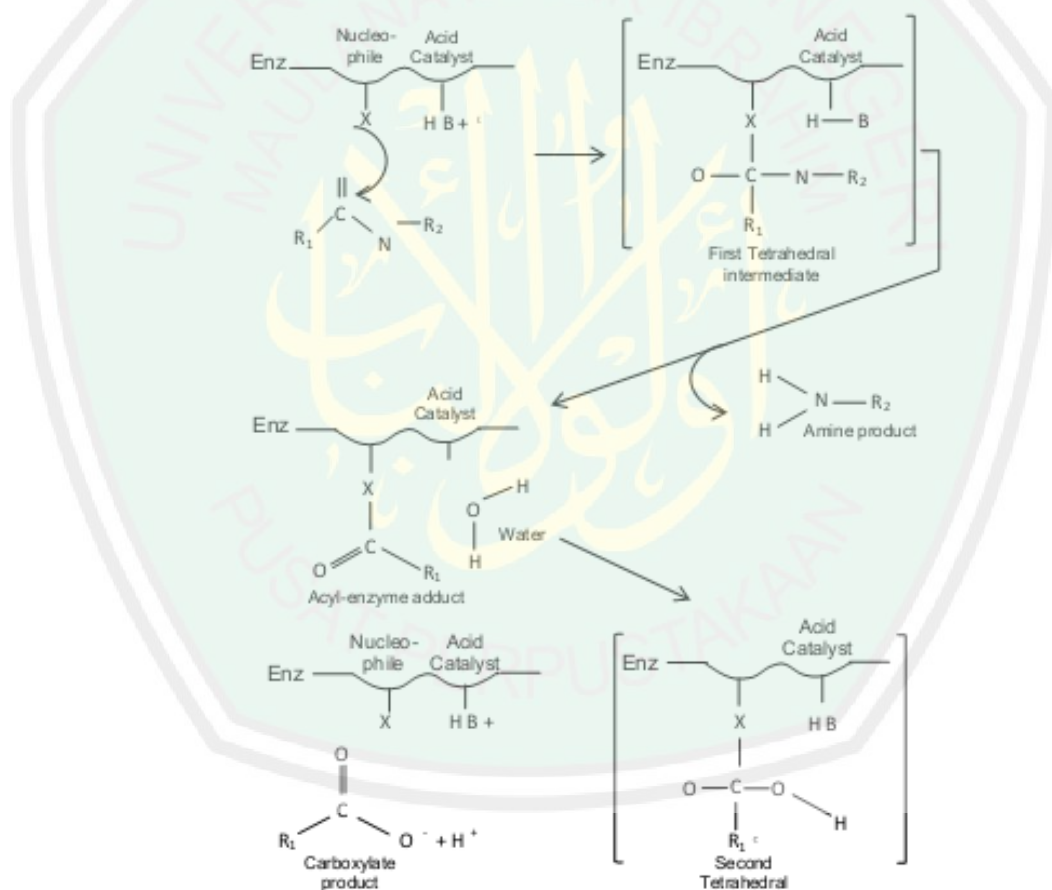
Gambar 2.1 Proses sintesis enzim protease (Jakubowski, 2017).

Transkripsi gen enzim terjadi karena adanya sinyal ekstraseluler (hormon, neurotransmitter, atau yang lainnya). Sinyal ini dapat memicu respon sinyal transduksi hingga akhirnya transkripsi gen enzim protease teraktivasi ataupun terhambat. Perubahan ini hasil dari perekrutan faktor-faktor transkripsi (protein) sekuens DNA yang mengatur transkripsi gen enzim. Selanjutnya, degradasi mRNA untuk enzim: tingkat mRNA untuk protein yang secara langsung akan menentukan jumlah protein yang disintesis. Kecilnya inhibitor RNA, berasal dari molekul microRNA dari DNA selular, yang dapat mengikat urutan-urutan tertentu dalam mRNA sebagai target enzim. Kompleks RNA beruntai ganda yang dihasilkan merekrut enzim (pemain “*Dicer*”) yang memecah kompleks dengan efek pengurangan translasi protein enzim dari mRNA. Kemudian terjadi perubahan translasi Co/Post: setelah enzim protein diterjemahkan dari mRNA, dapat mengalami perubahan untuk mempengaruhi tingkat enzim. Beberapa protein disintesis di dalam bentuk “pre” yang harus dapat diurai dan dibatasi oleh protease untuk mengaktifasi protein enzim. Beberapa protein tidak sepenuhnya dilipat dan harus mengikat faktor-faktor lain dalam sel untuk mengadopsi bentuk katalitik aktif. Akhirnya, protein aktif sebagai protease dari proteasome; suatu kompleks dalam sel, atau dalam lisosom, yaitu organel-organel dalam sel-sel yang mengandung enzim proteolitik (Gambar 2.1) (Jakubowski, 2017).

Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein yang menghasilkan peptida atau asam amino. Protein terdiri atas molekul asam amino yang jumlahnya bervariasi, berkisar antara 10 sampai ribuan yang berfungsi sebagai unit penyusun polimer protein yang terangkai melalui ikatan peptida. Protein yang memiliki lebih dari 10 asam amino disebut polipeptida,

sedangkan istilah protein ditujukan bagi polimer asam amino dengan jumlah di atas 100 (Suhartono, 1989).

Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti, 2002). Banyak protease mengkatalisis dengan reaksi yang sama dengan reaksi kimia umum, reaksi hidrolisis yang serupa ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Moran *et al.*, 1994).



Gambar 2.2 Mekanisme Umum Hidrolisis Enzimatis Substrat Peptida
(Moran *et al.*, 1994).

Hidrolisis ikatan peptida adalah reaksi penambahan-penghilangan, dimana protease bertindak sebagai nukleofilik atau bereaksi dengan membentuk satu molekul air (Bauer *et al.*, 1996). Secara umum nukleofilik membentuk intermediate tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif, yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air. Pada protease tertentu, adisi enzim-asil dapat dibentuk, seperti pada Gambar 2.2. intermediat tetrahedral kedua akhirnya dibentuk dan menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang diregenerasi (Moran *et al.*, 1994).

Berdasarkan cara kerjanya, Palmer (1991) membagi menjadi dua, yaitu 1) proteolisis terbatas, yang memecah hanya satu atau beberapa ikatan peptida tertentu dari sebuah protein target. Contohnya adalah perubahan prohormon menjadi hormon. 2) Proteolisis tak terbatas, yaitu mendegradasi protein menjadi asam amino penyusunnya. Dilihat dari letak pemutusan ikatan peptida, protease dibedakan menjadi endopeptidase atau proteinase (EC 3.4.21-99) dan eksopeptidase (EC 3.4.11-21). Endopeptidase memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase menguraikan protein dari ujung rantai sehingga dihasilkan satu asam amino dan sisa peptida.

Eksoprotease memecah protein dari ujung rantai polipeptida baik dari ujung amino atau karboksi substrat sehingga menghasilkan asam amino dan sisa peptide, sedangkan endoprotease memotong ikatan polipeptida protein pada bagian dalam sehingga menghasilkan sejumlah peptida. Kedua golongan protease tersebut masing-masing dapat dipilah lebih lanjut berdasarkan spesifisitas

substratnya. Eksopeptidase yang memotong rantai polipeptida dari ujung karboksil bebas disebut sebagai karboksipeptidase dan yang memotong dari ujung asam amino dikenal sebagai aminopeptidase. Protease juga mampu menghidrolisis protein yang pada ujung amino atau karboksil diganti dengan pteroil atau gugus asil, protease ini dikelompokkan sebagai peptidase omega. Penggolongan endopeptidase lebih kompleks dibandingkan eksopeptidase. Keunikan pemotongan endopeptidase sangat khas pada masing-masing jenis endopeptidase. Sebagian endopeptidase memotong ikatan peptida berdasarkan jenis asam amino tertentu pada atau yang berdekatan dengan situs pemotongan, sebagian enzim memotong ikatan polipeptida secara acak (Ward, 1983).

Berdasarkan komponen sisi aktifnya protease dipilah menjadi empat grup (Whitaker, 1994 dan Rao, *et al.*, 1998). Grup pertama yaitu protease serin (E.C.3.4.16 dan E.C.3.4.21) yang memiliki residu serin pada sisi aktifnya. Grup kedua adalah protease sistein (E.C.3.4.18 dan E.C.3.4.22) yang mempunyai gugus SH pada sisi aktifnya. Grup ketiga yaitu protease asam (E.C.3.4.23) yang memiliki residu asam aspartat pada sisi aktifnya. Grup terakhir adalah protease metal (E.C.3.4.17 dan E.C.3.4.24) yaitu protease yang aktivitasnya tergantung pada ikatan yang kuat pada kation divalen.

- a. Protease serin merupakan endopeptidase. Golongan protease serin memiliki asam amino serin pada sisi katalitiknya. Jika asam amino serin ini dimodifikasi dengan memfosforilasi gugus $-OH$ asam amino serin tersebut maka aktivitas enzimatik akan lenyap (Sadikin, 2002). Golongan ini terdiri dari dua kelompok yang berbeda. Kelompok kimotripsin yang meliputi enzim-enzim mamalia dan kelompok subtilisin yang meliputi

enzim bakteri. Struktur dari kedua kelompok ini berbeda tetapi memiliki geometri sisi aktif yang sama (Ward, 1985). Contoh protease serin adalah tripsin, kimotripsin dan elastase (Fersht, 1985).

- b. Protease sistein, sifat katalitik kelompok enzim ini ditentukan oleh asam amino sistein. Enzim ini tidak akan hilang aktivitasnya dengan fosforilasi tetapi akan hilang kemampuan katalitiknya dengan alkilasi. Contoh enzim ini adalah bromelin, papain dan katerpin (Sadikin, 2002). Protease jenis ini mempunyai aktivitas optimal pada pH netral, dan sangat dipengaruhi oleh logam pengkelat. Protease sistein dibagi menjadi dua golongan berdasarkan spesifitasnya. Klostipain, yang dihasilkan oleh *Clostridium histolyticum* menunjukkan spesifitas yang kuat terhadap asam amino utama karboksil pada situs pemutusan, sedangkan protease sterptokal memperlihatkan spesifitas terhadap substrat-substrat sintetik dari insulin peroksida (Ward, 1985).
- c. Protease aspartat, enzim ini memiliki urutan asam amino yang kaya akan aspartat dan glutamat. Asam aspartat diperlukan keberadaanya ditempat interaksi dengan molekul. Jika aspartat di tempat tersebut diubah menjadi amida maka sifat katalitik enzim akan hilang. Protease aspartat sering disebut juga protease karboksil, karena memerlukan gugus karboksil bebas dalam residu asam amino tertentu yang ada di bagian enzim tersebut berinteraksi dengan protein substrat dan memecahnya. Banyaknya asam amino asam ini juga menerangkan, mengapa protease golongan ini bekerja pada pH rendah (Sadikin, 2002), yaitu berkisar antara 2-6 dan memiliki titik isolistrik pada selang pH 3-5. Contoh enzim ini adalah kelompok

pepsin yang meliputi enzim-enzim pencernaan seperti pepsin, kimosin dan renin (Ward,1985).

- d. Protease logam atau metaloprotease, memerlukan adanya logam untuk aktivitasnya. Enzim ini berperan penting dalam sel-sel fagosit, seperti leukosit dan makrofag. Enzim ini berperan penting dalam perusakan rawan sendi dalam penyakit-penyakit sendi (Sadikin, 2002). Kelompok metaloprotease Zn, merupakan salah satu kelompok protease yang sering ditemukan pada bakteri dan jamur (Ferdian, 2006).

Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme. Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim, khususnya protease mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek, serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah (Thomas, 1984). Selain itu, mikroorganisme dapat hidup dan berkembangbiak dalam media limbah pertanian yang relatif lebih murah. Adanya mikroorganisme unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Keberadaan enzim merupakan sebuah fenomena alam yang menunjukkan tanda-tanda kebesaran Allah SWT bagi manusia yang mau berfikir. Sebagaimana firman Allah dalam Al-Qur'an surat Al- Baqarah (2) ayat 164 yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ وَالْفُلُكِ الَّتِي تَجْرِي فِي
الْبَحْرِ بِمَا يَنْفَعُ النَّاسَ وَمَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنَ السَّمَاءِ مِنْ مَّاءٍ فَأَحْيَا بِهِ الْأَرْضَ بَعْدَ
مَوْتِهَا وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَتَصْرِيفِ الرِّيْحِ وَالسَّحَابِ الْمُسَخَّرِ بَيْنَ السَّمَاءِ
وَالْأَرْضِ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿١٦٤﴾

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang, bahtera yang berlayar di laut membawa apa yang berguna bagi manusia, dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air, lalu dengan air itu dia hiduskan bumi sesudah mati (kering)-nya dan dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan, dan pengisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi; sungguh (terdapat) tanda-tanda (keesaan dan kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan*” (QS. Al- Baqarah: 164).

Berdasarkan Kitab Tafsir Ibnu Katsir (2003) bahwa segala sesuatu yang Allah turunkan ke bumi merupakan pembuktian keberadaan sang Pencipta. Allah sebarkan di bumi segala jenis hewan dengan bermacam-macam bentuk, warna, dan manfaat. Diantara bentuk ciptaan Allah adalah mikroba penghasil enzim.

Dimana manfaat enzim bagi kehidupan makhluk hidup yang diciptakan Allah sangatlah banyak, baik untuk proses metabolisme dalam tubuh maupun di luar tubuh. Salah satunya adalah enzim protease dalam suatu bakteri merupakan tanda kebesaran Allah yang perlu dimanfaatkan untuk meringankan beban manusia dalam memenuhi kebutuhan hidupnya.

Protease dihasilkan dari tiga sumber utama, yaitu tanaman, hewan dan mikroba. Enzim papain, bromelin dan fisin merupakan protease yang dihasilkan dari tanaman, sedangkan tripsin, kemotripsin, pepsin, dan rennin merupakan protease yang berasal dari hewan. Kelemahan tanaman sebagai sumber protease adalah kesulitan untuk melakukan ekstraksi enzim efisien karena membutuhkan peralatan berat untuk menghancurkan jaringan tanaman yang besar dan keras (Lehninger, 2005). Selain itu, pertumbuhan tanaman terlalu lama untuk produksi

enzim skala besar. Produksi protease dari hewan pun sangat terbatas, membutuhkan jumlah hewan dan biaya yang besar karena proses ekstraksi enzim dari jaringan hewan sulit dilakukan. Enzim dari hewan paling banyak digunakan dalam industri pangan adalah kimosin, yaitu pada industri keju, sedangkan enzim tanaman yang paling banyak digunakan dalam industri pangan adalah papain dan bromelin. Pada tahun 1950-1960, pemanfaatan enzim dari hewan dan tanaman mulai digantikan oleh enzim mikrobial (Nagodawithana dan Reed, 1993).

Lehninger (2005) mengatakan bahwa hal ini merupakan salah satu kelebihan mikroba dibandingkan hewan dan tanaman yang membutuhkan proses penghancuran sel untuk mendapatkan enzim yang diinginkan. Contoh mikroba penghasil enzim yang aman untuk pangan adalah *Aspergillus niger*, *A. orizae*, *A. awamori*, *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, dan *Saccharomyces cerevisiae* (Nagodawithana dan Reed, 1993). Galur-galur spesies tersebut telah digunakan bertahun-tahun dalam industri, bahkan telah dilakukan mutasi dan seleksi untuk mendapatkan enzim yang lebih baik (Chaplin dan Bucke, 1990).

Efektivitas kerja protease terhadap suatu protein ditentukan oleh struktur protein itu sendiri. Hal ini mempengaruhi kerentanan suatu protein terhadap hidrolisis oleh suatu protease. Struktur tersebut terdiri atas: 1) struktur primer, yaitu deret asam amino pada protein, 2) struktur sekunder (derajat pembentukan struktur sulur alfa dan beta, serta struktur acak, 3) struktur tersier, interaksi antar gugus alkil (R) satu sama lain, yaitu interaksi hidrofobik, ionik, ikatan hidrogen, gaya dispersi van der Waals dan jembatan disulfida, 4) struktur kuaterner merupakan asosiasi antar subunit molekul protein. Protease memecah ikatan peptida dengan bantuan molekul air (Suhartono, 1989).

2.2 Aplikasi Enzim Protease

Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena penggunaannya sangat luas. Enzim ini memainkan peranan yang penting pada industri makanan, misalnya dalam proses konversi susu menjadi keju, sebagai bahan pada deterjen maupun pada pemrosesan kulit (Saefudin, 2006). Oleh karena itu, tidak mengherankan apabila protease yang digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia (Ward, 1985). Nilai perdagangan enzim dunia mencapai 3-4 miliar dolar per tahun, 4-5 juta dolar di antaranya dari pasar Indonesia yang keseluruhannya diimpor dari negara-negara produsen enzim (Rajasa, 2003).

Aplikasi protease mikroorganisme di dalam industri sudah sangat luas. Baik industri pangan maupun non pangan. Penggunaan di dalam industri non pangan yaitu pada industri deterjen dan industri kulit. Di dalam industri pangan, digunakan pada industri roti, industri keju, industri daging, industri bir dan industri protein hidrolisat (Ward, 1983).

1. Industri deterjen

Enzim yang diaplikasikan pada deterjen harus memiliki karakteristik yang mendukung seperti pH basa, stabilitas suhu yang baik, ketahanan terhadap senyawa pengoksidasi dan pengikat, serta memiliki spesifitas yang luas (Ward, 1983).

2. Industri kulit

Enzim protease ditambahkan untuk membantu membebaskan bulu-bulu pada kulit dan melangsungkan hidrolisis sebagian protein untuk melunakkan kulit. Penambahan protease juga mengurangi kebutuhan akan pereaksi sulfida, sehingga

mengurangi limbah bersulfur dan mengurangi biaya untuk pengolahan limbah. Disamping itu juga pemakaian enzim protease dapat mempercepat waktu proses penghilang bulu (Suhartono, 1989).

3. Industri kue dan roti

Protease akan mengubah sifat-sifat viskoelastik adonan dengan menghidrolisis ikatan peptida pada interior gluten sehingga mempersingkat waktu pengembangan gluten. Enzim protease juga akan membebaskan asam amino dari gluten yang akan bereaksi dengan gula selama pembakaran roti sehingga menimbulkan aroma dan warna yang diinginkan (Suhartono, 1989).

4. Industri keju

Protease ini digunakan untuk menggumpalkan susu pada industri keju. Protease renin dari anak sapi telah mulai digantikan oleh *Endothia*, *Mucor pusillus* dan *Mucor meithei*. (Suhartono, 1989).

5. Industri bir

Pada proses pembuatan bir, enzim protease ditambahkan untuk mendegradasikan komponen protein penyebab kekeruhan, sehingga akan meningkatkan mutu produk (Suhartono, 1989).

6. Industri protein hidrolisat

Penggunaan protease dalam hal ini bertujuan untuk menghasilkan produk hidrolisis dari protein nabati, hidrolisis protein ikan, dan daging. Adanya beberapa kelemahan dalam pembuatan protein hidrolisat dengan asam dan basa membawa pada suatu alternatif lain yang dinilai cukup baik, yaitu pembuatan protein hidrolisat secara enzimatis. Proses netralisasi yang dilakukan pada pembuatan protein hidrolisat dengan asam akan menghasilkan kadar garam yang tinggi,

sedangkan dengan penambahan basa menyebabkan kerusakan pada asam amino sistein, arginin, dan lisin. Berbeda dari hidrolisis oleh asam dan basa, hidrolisis enzimatis tidak akan memisahkan gugus fungsional lain yang melekat pada protein selain asam amino (Suhartono, 1989).

7. Industri daging

Penggunaan enzim protease pada industri daging bertujuan untuk melunakkan daging. Cara kerja enzim ini yaitu dengan menghidrolisis serabut otot, elastin dan kolagen (Winarno, 1989).

2.3 *Bacillus subtilis*

Islam tidak hanya mengkaji makhluk hidup yang terlihat oleh mata telanjang tetapi juga mengkaji makhluk hidup yang tidak terlihat oleh mata telanjang seperti bakteri. Allah berfirman dalam Al Quran surat Al – Baqarah (2) ayat 26, sebagai berikut:

﴿ إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۚ فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۖ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا ۖ يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا ۚ وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴾

Artinya: “Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?. "Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik” (QS. Al- Baqarah: 26).

Menurut Asy-Syaukani (2008), maksud dari (فما فوقها) adalah sesuatu yang lebih rendah atau lebih kecil dari nyamuk”.

Maksud dari ayat tersebut adalah apa yang lebih kecil dari nyamuk dari segi fisik dan makna, mengingat nyamuk adalah hewan yang kecil, dan hewan yang lebih kecil dari nyamuk antara lain yaitu bakteri. *Bacillus* spp. digolongkan ke dalam kelas bakteri heterotrofik, yaitu protista bersifat uniseluler, termasuk dalam golongan mikroorganisme redusen atau yang lazim disebut sebagai dekomposer. Sebagian besar bakteri laut termasuk dalam kelompok bakteri bersifat heterotrofik dan saprofitik (Rheinheimer, 1980). Marga *Bacillus* merupakan bakteri yang berbentuk batang dapat dijumpai di tanah dan air termasuk pada air laut. Beberapa jenis menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis protein dan polisakarida kompleks (Pelczar dan Chan, 1988).

Genus *Bacillus* merupakan salah satu dari enam bakteri penghasil endospora. Endospora tersebut berbentuk bulat, oval, elips atau silinder, yang terbentuk di dalam sel vegetatif. Endospora tersebut membedakan *Bacillus* dari tipe-tipe bakteri pembentuk eksospora. Spora *Bacillus* pertama kali dideskripsikan oleh Cohn pada tahun 1872 pada *B. subtilis* yang semula disebut *Vibrio subtilis* oleh Ehrenberg pada 1835 (Gordon, 1981).

Spesies *Bacillus* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *B. cereus* dan *B. anthracis*. Mikroba jenis *Bacillus* tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein eksternal membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri (Doi, 1992).

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk basil (batang) dan bersifat aerob. *Bacillus subtilis* banyak ditemukan di alam seperti

pada tanah, air, dan beberapa dapat ditemukan sebagai flora normal pada usus manusia. Karakteristik unik dari bakteri ini adalah kemampuannya dalam membentuk endospora pada kondisi lingkungan yang ekstrim. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri termofilik, asidofilik, alkalifilik, halotoleran dan halofilik, yang mampu tumbuh pada suhu, pH dan salinitas yang ekstrim (Turnbull, 1996 dalam Amelia, 2012). *Bacillus subtilis* bersifat *non-patogen* dan *non-toxic* sehingga aman untuk digunakan dalam pengembangan riset pengetahuan dan beberapa digunakan sebagai probiotik (Cartwright, 2009).

Bacillus subtilis mempunyai kemampuan membentuk pertahanan diri yang kuat, dengan membentuk endospora yang bersifat melindungi sehingga dapat tahan pada kondisi lingkungan yang ekstrim. Bakteri ini membentuk endospora dengan bentuk endospora bulat atau silinder (Holt *et al.*, 2004). Saat sporulasi, spora ditebarkan ke udara, struktur spora tidak akan terjadi jika sel sedang berada pada fase pembelahan secara eksponensial, tetapi akan dibentuk terutama pada kondisi nutrisi terbatas misalnya jumlah karbon dan nitrogen sedikit (Madigan, *et al.*, 2003). Bakteri ini bersifat aerob dan anaerob (fermentasi), katalase positif, dan dapat ditemukan pada berbagai jenis habitat. *Bacillus subtilis* menghasilkan berbagai jenis enzim seperti alfa-amilase, beta-glukanase, glutaminase, maltogenik amilase, protease, pullulanase, dan xilanase (Pariza dan Johnson, 2001).

Klasifikasi bakteri *Bacillus subtilis* menurut Holt, *et al.* (2004) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Procaryotae

Filum : Firmicuter

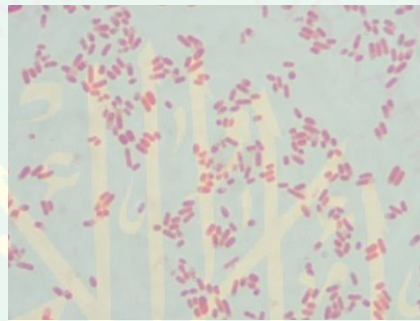
Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Familli : Bacillaceae

Genus : Bacillus

Spesies : *Bacillus subtilis*



Gambar 2.3 *Bacillus subtilis* (Kosim, 2010).

Bacillus subtilis yang digunakan merupakan bakteri endofit yang diisolasi dari daun Kenikir. Bakteri endofit merupakan bakteri saprofit yang hidup dan berasosiasi dengan jaringan tanaman tanpa menimbulkan suatu gejala penyakit pada tanaman tersebut. Dilaporkan bahwa keberadaan bakteri-bakteri endofit di dalam jaringan tanaman selain berperan dalam perbaikan pertumbuhan tanaman (*plant growth promotion*), juga karena kemampuannya menghasilkan zat pemacu tumbuh, memfiksasi nitrogen, memobilisasi fosfat, dan juga berperan dalam kesehatan tanaman (*plant health promotion*). Bakteri endofit diduga mampu meningkatkan sistem pertahanan tanaman terhadap gangguan penyakit tanaman karena kemampuannya untuk memproduksi senyawa antimikroba, enzim, asam

salisilat, etilena dan senyawa sekunder lainnya yang berperan menginduksi ketahanan tanaman (Backman dan Sikora 2008).

Bacillus subtilis dan *Bacillus licheniformis* banyak digunakan dalam mikrobiologi industri dikarenakan (1) laju pertumbuhannya yang cepat pada proses fermentasi, (2) kemampuannya dalam mensekresikan protein (enzim) ke medium ekstraselular, dan (3) status keamanannya yang GRAS (*generally regarded as safe*) (Schallmey, *et al.*, 2004).

Menurut Naiola dan Widhyastuti (2002), penggunaan mikroorganisme untuk produksi protease memiliki beberapa kelebihan diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah. Salah satu mikroorganisme yang termasuk dalam kategori di atas adalah *Bacillus sp.*

2.4 Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Menurut Hames dan Hooper (2005), faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, suhu, senyawa inhibitor dan aktivator. Semua enzim adalah protein, dan aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Seperti halnya protein lain, enzim mempunyai berat molekul berkisar 12.000 sampai 1 juta. Oleh karena itu enzim berukuran besar dibandingkan dengan substrat atau gugus fungsional targetnya (Sadikin, 2002).

Penataan tertentu pada rantai samping asam amino suatu enzim di sisi aktifnya menentukan tipe molekul yang dapat terikat dan bereaksi. Biasanya ada sekitar lima rantai samping dalam enzim apapun. Selain itu banyak enzim yang molekul molekul non protein kecil yang terhubung dengan sisi aktif atau

didekatnya. Molekul-molekul ini disebut kofaktor atau koenzim (Ngilih, 2009). Beberapa enzim memerlukan kofaktor atau koenzim untuk aktifitas katalitiknya. Bagian holoenzim (koenzim dan ion) bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian apoenzim (protein) terdenaturasi oleh panas (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994). Berikut dijelaskan tentang faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim protease, diantaranya:

1. Suhu

Suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisa suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Sejalan dengan meningkatnya suhu, makin meningkat pula aktifitas enzim. Secara umum, setiap peningkatan sebesar 10°C diatas suhu minimum, aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan di dalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada didalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1997).

Peningkatan suhu pada suatu reaksi berhubungan dengan bertambahnya energi kinetik molekul sehingga kontak antara substrat dan enzim dapat terjadi dengan frekuensi yang lebih banyak (Suhartono, 1989). Namun suhu yang semakin meningkat akan mendenaturasi enzim karena enzim termasuk protein (Martin, *et al.*, 1983). Hal ini dibuktikan pada aktivitas protease dari *Bacillus* sp 31 yang meningkat seiring dengan bertambahnya suhu dan mencapai aktivitas

optimum pada suhu 60°C yaitu 146,40 U/ml selanjutnya pada suhu 70°C dan 80°C terjadi penurunan aktivitas masing-masing sebanyak 127,70 U/ml dan 80,30 U/ml (Utarti, *et al.*, 2009). Selain itu, sedikit pergeseran pH dari pH optimum akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalisis enzim (Murray *et al.*, 2003).

2. Konsentrasi substrat.

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin banyaknya substrat terikat dengan enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik-titik jenuh tidak dapat lagi meningkatkan kecepatan laju reaksi (Pratiwi, 2008).

Keseimbangan yang terjadi antara enzim dan substrat menunjukkan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu di alam ini dalam keadaan yang seimbang. Konsep keseimbangan yang terjadi dalam alam telah tercantum dalam Al- Qur'an surat Al- Mulk (67) ayat 3, yang berbunyi:

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَوَاتٍ طِبَاقًا ۚ مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ ۚ فَارْجِعِ
الْبَصَرَ هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ ﴿٣﴾

Artinya: “Yang Telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka Lihatlah berulang-ulang, Adakah kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang?”(QS. Al- Mulk: 3).

Maksud dari ayat tersebut ialah tiada segala sesuatu yang diciptakan Allah di alam semesta ini dalam keadaan tidak seimbang (Al-Mahalli dan As-Suyuti, 2008).

Keseimbangan juga terjadi antara enzim dengan substratnya, dimana laju reaksi enzim di pengaruhi oleh jumlah substrat. Semakin banyak substrat maka semakin banyak pula substrat yang menempati sisi aktif enzim. Apabila jumlah substrat tidak seimbang maka enzim akan mengalami kejenuhan.

3. pH

Faktor pH sangat mempengaruhi struktur dan aktivitas biologis enzim. Interaksi ionik yang terjadi di dalam strukturnya akan menstabilkan enzim dan memungkinkan enzim untuk mengenali dan berikatan dengan substratnya (Nelson dan Cox, 2005). Karakteristik pH yang menunjukkan aktivitas katalitik maksimum disebut pH optimum. Sedikit perubahan pH akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalis enzim. Perubahan pH akan menyebabkan denaturasi pada protein penyusun enzim itu sendiri (Murray *et al.*, 2003). pH optimum berbagai spesies *Bacillus* dalam karakteristik enzim protease ekstraseluler bervariasi yakni berkisar 8-10 (Soeka dan Sulistyani, 2014).

Enzim menyediakan banyak tempat untuk pengikatan proton karena enzim adalah protein yang tersusun oleh asam amino yang dapat mengikat proton pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lain. Gugus fungsional pada sisi aktif yang dapat terionisasi yang dikatalisa oleh enzim (Suhartono, 1989). Gugus fungsional yang memegang peranan penting pada suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim terdapat pada rantai asam amino basa dan asam amino asam (Whitaker, 1994). Pada skala deviasi pH yang besar, perubahan pH akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi karena adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan stuktur 3 dimensi enzim (Baehaki, *et al.*, 2005).

4. Ada tidaknya aktifator dan inhibitor.

Jika terdapat pengurangan laju reaksi oleh suatu senyawa, senyawa tersebut dinamakan inhibitor. Inhibitor dapat bersaing dengan substrat dalam berikatan dengan enzim, sehingga menghalangi substrat terikat pada tapak aktif enzim. Peningkatan laju reaksi yang disebabkan oleh aktifator adalah kebalikan dari efek inhibitor (Poedjiaji dan Supriyanti, 1994).

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi juga oleh keberadaan ion logam (Suhartono 1989). Ion logam dapat berfungsi sebagai aktifator atau inhibitor. Secara kimiawi, suatu kofaktor tidak dapat dibedakan dari inhibitor. Setelah enzim dan substrat berinteraksi, barulah dapat dilihat perbedaannya. Adanya aktifator yang berikatan dengan enzim dapat menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim, sedangkan inhibitor jika berikatan dengan enzim menyebabkan penurunan kecepatan reaksi enzimatik (Whittaker, 1994).

Hasil penelitian Utarti, *et al* (2009), menunjukkan bahwa ion logam yang berfungsi sebagai aktifator protease dari *Bacillus* sp31 adalah ion Fe^{2+} . Adinarayana, *et al* (2003) menyatakan bahwa, serin alkalin protease dari *B. subtilis* PE-11 aktifaktornya adalah ion Ca^{2+} , Mg^{2+} dan Mn^{2+} . Sementara pada protease dari *Bacillus* sp APR-4 aktifaktornya adalah ion Ca^{2+} dan ion Cu^{2+} (Kumar dan Bhalla, 2004). Penambahan ion Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{2+} , dan Zn^{2+} pada reaksi enzimatik yang dikatalis oleh protease *Bacillus* sp31 menurunkan aktivitasnya (Utarti, *et al.*, 2009).

2. 5 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Sa'id (1987) menyatakan bahwa faktor-faktor yang penting untuk diperhatikan dalam fermentasi enzim adalah seleksi mikroba, pengaturan kondisi

fermentasi dan pengenalan siklus pertumbuhan. Persyaratan utama dalam seleksi mikroba adalah kemudahan dalam metodologi, sehingga pengujian yang cepat untuk sejumlah besar mikroba dapat dikerjakan. Kondisi fermentasi yang harus diperhatikan adalah pH, suhu, transfer oksigen dan nutrisi bagi pertumbuhan mikroba, khususnya senyawa-senyawa yang mengandung karbon, nitrogen, fosfor, belerang dan garam-garam mineral. Menurut Aunstrup (1979), untuk mendapatkan protease ada dua hal yang perlu diperhatikan yaitu seleksi galur dan kontrol lingkungan. Seleksi galur dimaksudkan untuk mendapatkan galur mikroorganisme penghasil protease dalam jumlah dan aktivitas yang tinggi, sedangkan kontrol lingkungan dilakukan dengan mengoptimalkan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan produksi protease. Menurut Ward (1983), faktor-faktor tersebut adalah pH, komposisi medium, kondisi aerob atau anaerob dan sebagainya.

Pengukuran kekeruhan medium pada selang waktu tertentu dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri memperbanyak sel dalam medium. Kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh, berkembang, memperbanyak diri dan mensekresikan enzim ke medium kultur. Kekeruhan tersebut diukur dengan mengukur turbiditas medium pada panjang gelombang tertentu. Absorbansi yang terukur ini tidak hanya mengukur jumlah sel hidup, tetapi sel yang mati juga ikut terukur (Susanti dan Ariani, 2003).

Pertumbuhan dapat diamati dari meningkatnya jumlah sel atau massa sel (berat kering sel). Pada umumnya bakteri dapat memperbanyak diri dengan pembelahan biner yaitu dari satu sel menjadi dua sel baru, maka pertumbuhan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel. Waktu yang diperlukan untuk

membelah diri dari satu sel menjadi dua sel sempurna disebut waktu generasi. Waktu yang diperlukan mikroba untuk menggandakan diri tidak sama, dari beberapa menit, beberapa jam sampai beberapa hari tergantung kecepatan pertumbuhannya. Kecepatan pertumbuhan merupakan perubahan jumlah atau massa sel per unit waktu (Sumarsih, 2003).

Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis suatu substrat protein merupakan salah satu cara untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dalam keberlangsungan hidup bakteri tersebut. Nutrisi dari *Bacillus subtilis* dapat diperoleh dengan cara menghasilkan enzim ekstraseluler seperti protease yang memecah protein menjadi asam amino. Enzim protease merupakan salah satu bentuk rezeki yang Allah SWT berikan kepada makhluk-Nya yang sangat dibutuhkan dalam metabolisme tubuh makhluk hidup yang berguna sebagai biokatalisator dalam memecah protein menjadi senyawa yang lebih sederhana. Berdasarkan kajian Islam diterangkan bahwa Allah telah menjamin rezeki seluruh makhlukNya sebagaimana dalam Al-Qur'an surat Huud (11) ayat 6 yang berbunyi:

﴿ وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ إِلَّا عَلَى اللَّهِ رِزْقُهَا وَيَعْلَمُ مُسْتَقَرَّهَا وَمُسْتَوْدَعَهَا كُلٌّ فِي

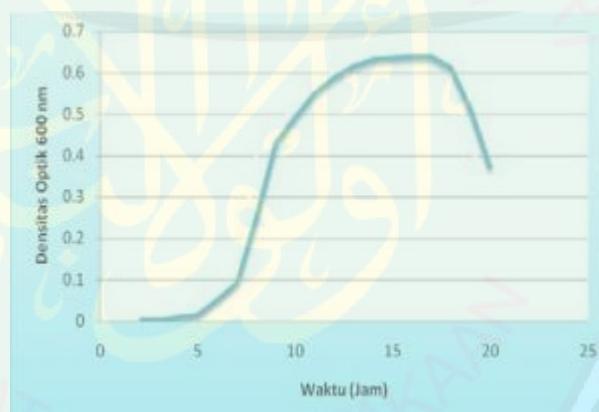
كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦﴾

Artinya: “Dan tidak ada suatu binatang melata pun di bumi melainkan Allah-lah yang memberi rezekinya, dan dia mengetahui tempat berdiam binatang itu dan tempat penyimpanannya. semuanya tertulis dalam Kitab yang nyata (*Lauh mahfuzh*)” (QS. Al-Huud: 6).

Menurut Al-Qarni (2007), ayat diatas menjelaskan bahwa Allah memberi dan menjamin rezeki kepada setiap makhluk ciptaan-Nya. Dia mengetahui tempat berdiamnya makhluk, baik ketika hidup maupun setelah matinya. Semuanya tersebut telah tertulis dalam kitab yang nyata; kitab yang berisi qadha yang telah ditentukan.

Kehidupan seluruh makhluk di muka bumi telah ditentukan oleh takdir Allah. Oleh karena itu, tak satupun makhluk ciptaan-Nya yang terlupakan, seperti terpenuhinya nutrisi dari bakteri *Bacillus subtilis* dengan adanya kemampuan yang Allah karuniakan untuk dapat menghidrolisis suatu substrat yang dapat digunakan dalam keberlangsungan hidupnya.

Mengukur pertumbuhan mikroba padat digunakan beberapa metode. Tetapi tidak satupun prosedur yang dapat diaplikasikan pada semua situasi. Dalam banyak kasus, khususnya yang menyangkut fermentasi komersial maka media untuk pertumbuhan dan perkembangan produk sangat kompleks sehingga metode langsung tidak dapat digunakan dan cara yang diperlukan adalah cara yang tidak langsung (Judoamidjojo, *et al.*, 1990).



Gambar 2.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri (Kosim, 2010)

Kurva pertumbuhan diawali dengan fase awal (lag) yang merupakan masa penyesuaian mikroba. Pada fase tersebut terjadi sintesis enzim oleh sel yang dipergunakan untuk metabolisme metabolit. Setelah fase awal selesai, mulai terjadi reproduksi selular. Konsentrasi selular meningkat, mula mula perlahan kemudian semakin lama akan meningkat sampai pada suatu saat laju pertumbuhan

atau reproduksi selular mencapai titik maksimal dan terjadi pertumbuhan secara logaritmik atau eksponensial (Putranto, 2006). Fase logaritmik dicirikan dengan suatu garis lurus pada plot antara $\ln$ berat kering terhadap waktu. Periode eksponensial merupakan periode pertumbuhan mikroorganisme yang stabil dengan laju pertumbuhan yang spesifik (μ) konstan (Panji, *et al.*, 2002). Selanjutnya setelah substrat atau persenyawaan tertentu yang dibutuhkan oleh pertumbuhan bakteri dalam media biakan mendekati habis dan terjadi penumpukan produk-produk penghambat, maka terjadi penurunan laju pertumbuhan bakteri tersebut. Fase penurunan ditandai oleh berkurangnya jumlah sel hidup (*viable*) dalam media pertumbuhan akibatnya terjadi kematian (*mortalitas*) (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994).

Enzim secara efektif diproduksi pada fase eksponensial karena pada fase ini pertumbuhan biomassa mikroba mengalami peningkatan dan pada fase ini pula mikroba sangat efektif dalam mensintesis enzim untuk kelangsungan hidupnya Sulistyaningtyas, *et al.*, (2013). Waktu optimum untuk produksi enzim protease adalah pada saat akhir fase eksponensial atau saat akan memasuki fase stasioner (Ferdian, 2006).

2.6 Limbah Cair Tahu

Media produksi untuk menghasilkan enzim harus memenuhi kebutuhan dasar untuk menghasilkan sel serta produk. Nutrisi utama bagi pertumbuhan mikroba adalah sumber karbon, nitrogen dan mineral, terutama fosfat. Nitrogen sangat diperlukan untuk pertumbuhan sel, sedang unsur - unsur karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis (Aunstrup, 1979). Agar mikroba dapat tumbuh dan berkembang dengan baik di dalam media, diperlukan persyaratan

tertentu, yaitu : 1. Di dalam media harus terkandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba, yaitu nitrogen, karbon, vitamin, garam mineral dan air (Lay dan Sugyo, 1992). 2. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. 3. Media harus dalam keadaan steril (Suriawiria, 1990).

Berbagai sumber makanan yang bersifat organik atau anorganik baik yang merupakan senyawa sederhana maupun senyawa kompleks tersedia di alam. Pemilihan sumber makanan untuk memproduksi enzim sangat tergantung dari jenis mikroorganisme dan jenis enzim yang ingin diproduksi, ketersediaannya di alam dan faktor ekonomis. Pemanfaatan limbah yang tersedia melimpah di alam atau substrat yang bernilai ekonomis rendah untuk digunakan sebagai media sangat diutamakan. Proses fermentasi merupakan proses perubahan substrat menjadi produk dengan bantuan enzim. Dalam proses ini perlu diperhatikan komposisi media optimum agar proses berlangsung baik. Teknologi fermentasi telah banyak memanfaatkan limbah untuk menghasilkan berbagai produk. Limbah yang akan digunakan sebagai media pertumbuhan diharapkan mempunyai kadar nutrisi yang tinggi, mudah didapat, dan harganya relatif murah (Suhartono, 1996).

Seiring perkembangan teknologi, limbah pertanian dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk menumbuhkan mikroba, untuk memproduksi berbagai jenis bahan yang bermanfaat bagi industri, seperti enzim dan antibiotika. Salah satu limbah pertanian yang cukup berlimpah adalah limbah cair tahu yang dihasilkan oleh pabrik-pabrik tahu. Limbah cair tahu ini penggunaannya masih sangat terbatas dan umumnya dibuang ke sungai, yang dapat mengakibatkan pencemaran sungai.

Industri tahu menghasilkan dua macam limbah yaitu limbah padat dan limbah cair. Limbah padat berupa ampas tahu yang diperoleh pada saat ekstraksi susu kedelai (penyaringan), sedangkan limbah cair dihasilkan setelah koagulasi protein susu kedelai dan pada saat proses pengepresan atau pencetakan tahu. Limbah cair tahu mengandung 9% protein, 0.69% lemak, dan 0.05% karbohidrat (Triyono & Hasanudin 1998). Komponen nutrisi lengkap dari limbah cair tahu yang masih mengandung protein dengan kadar tinggi memungkinkan mikroorganisme penghasil protease tumbuh di dalamnya (Sulistyaningtyas 2006).

Proses produksi tahu menghasilkan limbah cair antara 15-20 L/kg bahan baku kedelai dan limbah padat. Jumlah produksi tahu yang semakin meningkat akan mengakibatkan jumlah limbah cair yang dihasilkan semakin melimpah. Mengingat kedelai sebagai bahan baku pembuatan tahu yang memiliki kadar protein (34-45%), karbohidrat (12-30%), lemak (18-32%), dan air (7%) (Radiyah, *et al.*, 2000), akibatnya limbah cair tahu memiliki zat-zat organik yang tinggi. Jika limbah cair industri tahu tersebut dibuang langsung ke lingkungan tanpa proses pengolahan, akan terjadi blooming (pengendapan zat-zat organik pada perairan), yang menyebabkan proses pembusukan dan berkembangnya mikroorganisme patogen (Sudaryati, *et al.*, 2007). Limbah cair dari tahu mengandung bahan organik dan nutrisi tinggi yang terdiri dari air 90,72 %, protein 1,8%, lemak 1,2%, serat kasar 7,36%, dan abu 0,32 % (Rahardjo dalam Trismilah, *et al.*, 2001). Limbah cair tahu mengandung bahan organik dan nutrisi tinggi. Kandungan gizi limbah cair tahu per 100 gram terdiri dari air 4,9 gram, protein 17,4 gram, lemak 5,9 gram, karbohidrat 67,5 gram, mineral 4,3 gram, kalsium 19 mg, fosfor 29 mg, zat besi 4 mg dan vitamin B 0,2 mg (Mufarrihah, 2009). Media yang dapat

memproduksi protease memiliki ratio C/N antara 1,8-8 (Meyrath, 1975). Yanus (1988) menyatakan bahwa limbah cair tahu memiliki ratio C/N sebesar 7,9 dan adanya mineral pada limbah cair tahu akibat penambahan batu tahu pada pembuatan tahu dapat berperan sebagai pengimbas sintesis protease.

Jumlah industri tahu di Indonesia mencapai kurang lebih 84.000 unit usaha. Dengan kapasitas produksi lebih dari 2,56 juta ton per tahun. Industri tahu memproduksi limbah cair sebanyak 20 juta meter kubik per tahun dan menghasilkan emisi sekitar 1 juta ton CO₂ ekuivalen. Sebanyak 80% industri tahu berada di Pulau Jawa. Dengan demikian, emisi yang dikeluarkan pabrik tahu di Jawa mencapai 0,8 juta ton CO₂ ekuivalen (Setiawan dan Rusdijati, 2014).

Limbah cair tahu merupakan jenis limbah yang penggunaannya masih sangat terbatas dan umumnya dibuang ke sungai, yang dapat mengakibatkan pencemaran sungai. Pencemaran pada sungai merupakan salah satu hal yang dapat membuat kerusakan di bumi. Padahal sebagai khalifah di bumi kita tidak boleh merusak bumi. Perintah untuk tidak boleh merusak bumi terdapat dalam surat Al Baqarah (2) ayat 11 yang berbunyi:

وَإِذَا قِيلَ لَهُمْ لَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ قَالُوا إِنَّمَا نَحْنُ مُصْلِحُونَ ﴿١١﴾

Artinya: *"Dan bila dikatakan kepada mereka: 'Janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi'. mereka menjawab: 'Sesungguhnya kami orang-orang yang mengadakan perbaikan.'" (QS. Al-Baqarah: 11).*

Ath-Thabari (2007) menafsirkan bahwasanya bentuk kerusakan yang terjadi di muka bumi yang dilakukan oleh manusia, baik itu bersifat lahiriyah (fisik) maupun batiniah (moral).

Pembuangan limbah pada lingkungan merupakan salah satu contoh bentuk kerusakan fisik yakni terhadap suatu habitat makhluk hidup yang berada di lingkungan tersebut. Misalnya, maraknya pembuangan limbah cair tahu dari

pabrik produksi tahu pada lingkungan perairan (sungai) yang akan merusak habitat hewan maupun tumbuhan pada perairan tersebut. Sehingga, perlu adanya pemanfaatan yang dilakukan seperti penggunaan limbah sebagai media produksi enzim.

2.7 Dedak

Definisi dedak menurut FAO adalah hasil samping proses penggilingan padi yang terdiri dari lapisan sebelah luar (aleuron) dari butiran padi dengan sejumlah lembaga biji (Nurcholis, 2007). Dedak merupakan hasil ikutan proses pemecahan kulit gabah yang terdiri dari lapisan kutikula sebelah luar dan hancuran sekam serta sebagian kecil lembaga yang masih tinggi kandungan protein, vitamin, dan mineral. Menurut (Schalbroeck, 2001), produksi dedak padi di Indonesia cukup tinggi per tahun dapat mencapai 4 juta ton dan setiap kuintal padi dapat menghasilkan 18-20 gram dedak. Dedak mengandung protein 13,00 % lemak 13,00%, dan serat kasar 12,00 % dapat dipakai sebagai bahan pakan ternak (Schalbroeck, 2001).

Penggilingan satu ton gabah menghasilkan dedak sebanyak 60-80 kg. Bergantung pada varietas beras dan derajat penggilingannya (Purbasari dan Silviana, 2008). Gusnimar (2011), mengemukakan bahwa dedak pada kadar air 14% mempunyai komposisi sebagai berikut: protein 11,3-14,9%; lipida 15,0-19,7%; serat kasar 7,0-11,4%; abu 6,6-9,9%; karbohidrat 34,1-52,3%; pati 13,8%; neutral detergent fiber 23,7-28,6%; pentosan 7,0-8,3%; hemiselulosa 9,5-16,9%; selulosa 5,9-9,0%; asam poliuonat 1,2%; gula bebas 5,5-6,9% dan lignin 2,8-9,3% yang kesemuanya dapat menunjang pertumbuhan bakteri. Gunawan (1975) menyatakan bahwa penambahan dedak dalam substrat akan dimanfaatkan oleh

mikroorganisme sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangannya, sehingga menyebabkan mikroba cepat tumbuh dan mudah berkembang biak.

2.8 Pengujian Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas protease ini menggunakan metode Bregmeyer dan Grassal (1983). Dalam metode ini menggunakan kasein sebagai substrat yang akan dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino. Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini dengan berpasang pasangan. Allah berfirman dalam Al Qur'an surat Adz-Dzariyaat (51) ayat 49 yang berbunyi:

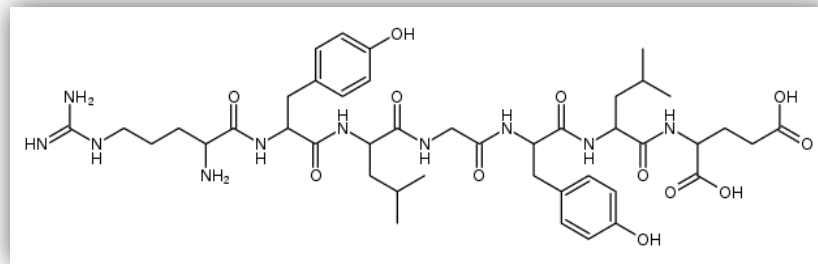
وَمِنْ كُلِّ شَيْءٍ خَلَقْنَا زَوْجَيْنِ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ

Artinya: *“Dan segala sesuatu kami ciptakan berpasang-pasangan supaya kamu mengingat kebesaran Allah”* (QS. Adz-Dzariyaat: 49).

Ibnu katsir (2003) dalam tafsirnya menjelaskan bahwa maksud ayat tersebut adalah seluruh makhluk itu berpasang-pasangan; langit dan bumi, siang dan malam, matahari dan bulan, darat dan lautan, terang dan gelap, iman dan kufur, kematian dan kehidupan, kesengsaraan dan kebahagiaan, surga dan neraka, bahkan sampai pada hewan dan tumbuh-tumbuhan.

Allah menciptakan segala sesuatu disertai dengan pasangannya. Seperti halnya menciptakan laki laki dengan perempuan, siang dengan malam, manis dengan pahit. Begitu pula enzim yang diciptakan oleh Allah berdampingan dengan substratnya. Enzim memiliki spesifitas atau kekhasan terhadap substrat (Pelczar dan Chan, 1988).

Kasein merupakan protein susu yang memiliki susunan asam amino yang terdiri dari Arginin (Arg) - Tirosin (Tyr) – Leusin (Leu) – Glisin (Gly) – Tirosin (Try) – Leusin (Leu) – Asam Glutamat (Glu) (Gambar 2.5) (Panic, 2017).



Gambar 2.5 Struktur Kasein (Panic, 2017)

Prinsip kerja metode Bregmeyer dan Grassal (1983) adalah pengukuran asam amino tirosin yang terhidrolisis setelah dipisahkan dari substratnya. Awalnya, enzim akan memecah substrat kasein dengan bantuan air menjadi asam amino dan peptida. Laju pembentukan peptida inilah yang menjadi tolak ukur aktivitas katalisis protease. Selanjutnya, asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein dipisahkan dari protein lain yang belum terhidrolisis dengan menggunakan TCA (*Trichloroacetic acid*), sehingga protein dan peptida yang berukuran besar akan terendapkan. Penambahan TCA juga berfungsi untuk menginaktivasi protease dan menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama inkubasi protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis dibantu dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Tirosin yang larut dalam filtrat akan bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu menghasilkan warna biru. Penambahan Na_2CO_3 bertujuan untuk mendapatkan pH sekitar 11,5 yang merupakan pH optimum untuk intensitas dan stabilitas warna biru dan diukur serapannya dengan panjang gelombang 578 nm. Besarnya serapan ini berbanding lurus dengan dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis. satuan aktivitas protease adalah unit. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya ml

enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol tirosin tiap menit (Sumarlin, 2010). Tirosin merupakan molekul asam amino yang mempunyai gugus fenol dan bersifat asam lemah (Poedjiadi, 2012). Tirosin digunakan sebagai larutan standar dalam uji aktivitas protease untuk mengukur aktivitas protease dalam memecah protein menjadi asam amino (Sulastri, 2008).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yang terdiri dari suhu dan pH. Masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

a. Faktor pertama : suhu (T)

T1 : Suhu 25°C

T2 : Suhu 35°C

T3 : Suhu 45°C

T4 : Suhu 55° C

b. Faktor kedua : pH (P)

P1 : pH 7

P2 : pH 8

P3 : pH 9

Berdasarkan kedua faktor tersebut diperoleh kombinasi perlakuan, sebagai berikut:

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Suhu dan pH

Suhu(T) pH(P)	25°C	35°C	45°C	55°C
7	T1P1	T2P1	T3P1	T4P1
8	T1P2	T2P2	T3P2	T4P2
9	T1P3	T2P3	T3P3	T4P3

Jumlah pengulangan dari 12 perlakuan dihitung berdasarkan rumus pengulangan sebagai berikut:

(T-1) (R-1)	≥ 15	Keterangan
(12-1) (R-1)	≥ 15	T = Jumlah Perlakuan
$12R - 12 - R + 1$	≥ 15	R = Jumlah Pengulangan
$11R - 11$	≥ 15	15 = Derajat Bebas untuk RAL
R	$\geq (15 + 11)/11$	
R	$\geq 2,363 = 3$	

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juli - September 2017, di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari 2 macam yaitu variabel bebas dan terikat.

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini terdiri dari perlakuan suhu (25°C, 35°C, 45°C, 55°C) dan perlakuan pH (7, 8, 9).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pengukuran aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*.

3.4 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease ini antara lain adalah : tabung reaksi, rak tabung, cawan petri, pipet, erlenmeyer, gelas ukur, *beaker glass*, spatula, tabung sentrifuse, autoklaf, timbangan digital, *vortex mixer*, *shaker incubator*, jarum ose, *hot plate*, mikropipet, bunsen, inkubator, sentrifuse, pH meter, spektrofotometri, LAF.

Bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas bakteri protease secara kuantitatif antara lain adalah : bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari daun Kenikir. Media alternatif : Dedak halus dan Limbah Cair Tahu (LCT), Aquades, NA (*Nutrient Agar*), media selektif susu skim agar, kasein hammersten, larutan TCA 0,1 mol/L, *Tyrosin standart* 5mmol/L, Na_2CO_3 0,4 mol/L, pereaksi Folin Ciocalteau, buffer phosphat 0,01M (pH 7, 8), buffer tris HCl 0,01M (pH 9), HCL 0,05M, CaCl_2 12 mmol/L, aluminium foil, alkohol 70%, NaOH, HCl 1M dan 0,05 mol/L, dan ekstrak enzim protease.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media

3.5.1.1 Pembuatan Media Agar Nutrien

Sebanyak 10 g NA bubuk dilarutkan dalam 500 ml akuades dan dihomogenkan diatas *hotplate stirrer*. Sebagian NA dituangkan ke dalam tabung reaksi untuk memelihara isolat dalam media agar miring. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebanyak 15-20 ml media NA dituangkan ke dalam cawan petri steril (Soeka dan Sulistiani, 2014).

3.5.1.3 Media Produksi Protease

Media produksi protease dalam penelitian ini merupakan media campuran limbah cair tahu dan dedak (lampiran 4, gambar a). Adapun Limbah cair tahu disaring terlebih dahulu untuk memisahkan kotoran. Sebanyak 12,5 g dedak halus dalam 250 ml limbah cair tahu. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit (Naiola dan Widhyastuti, 2002)

3.5.2 Peremajaan *Bacillus subtilis*

Peremajaan *Bacillus subtilis* dilakukan dengan menginokulasikan isolat tersebut pada *Nutrient Agar* (NA) miring (lampiran 4, gambar b). Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Soeka dan Sulistiani, 2014).

3.5.3 Uji Kualitatif Protease

Isolat *Bacillus subtilis* ditumbuhkan pada media SMA (*Skim Milk Agar*) yang dibuat dari 3 g susu skim bubuk dan 1 g agar dilarutkan dalam 150 ml akuades dan disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (lampiran 4, gambar c). Sebanyak 10 µL isolat diteteskan diatas kertas cakram yang diletakkan diatas media SMA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rizaldi, 2016). Hasil positif ditandai dengan adanya zona bening disekitar tumbuhnya koloni bakteri. Sebaliknya, hasil negatif ditandai dengan tidak adanya zona bening disekitar tumbuhnya koloni bakteri (Ferdian, 2006). Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur diameter areal bening dan diameter koloni bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan diameter areal bening dengan diameter koloni bakteri (Baehaki, 2011).

3.5.4 Kurva Perumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*

Sebanyak 250 ml media campuran limbah cair tahu dan dedak. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah mencapai suhu ruang kemudian diinokulasikan 8 ose *Bacillus subtilis*. Dan diletakkan dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 200 rpm suhu 37°C. Setiap 4 jam jumlah bakteri dalam labu diukur OD nya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Kurva pertumbuhan digunakan untuk mengetahui fase eksponensial bakteri menghasilkan enzim protease yang akan digunakan pada perlakuan selanjutnya (Ferdian, 2006).

3.5.5 Produksi Enzim Protease

Media yang digunakan untuk produksi protease pada penelitian ini ialah campuran limbah cair tahu dengan dedak. Sebanyak 250 ml media campuran limbah cair tahu dan dedak dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian disterilisasi. Lalu dimasukkan inokulum segar sebanyak 10% (v/v) setelah media berada pada suhu ruang dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama akhir fase logaritmik awal fase stasioner. Ekstraksi enzim dilakukan dengan menggunakan sentrifuse pada suhu 4°C dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit. Kemudian filtrat yang telah memisah dari pellet diambil. Filtrat ini merupakan enzim kasar (lampiran 4, gambar d) (Sutandi, 2003).

3.5.6 Pengukuran Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Protease

Aktivitas proteolitik dari enzim yang dihasilkan diukur dengan metode Bergmeyer (1983). Tiga tabung disediakan, masing-masing untuk blanko, standar dan sampel. Sebanyak 1 ml buffer fosfat (0.01M, pH 7) dan 1 ml buffer tris HCl

(0.01M, pH 8 dan pH 9) dimasukkan dalam masing-masing tabung. Dilanjutkan dengan pemberian 1 ml substrat kasein (20 mg/ml, pH 7) dan 0.2 ml HCl (0.05M) ke dalam masing-masing tabung. Tabung blanko, standar dan sampel diisi dengan masing-masing 0.2 ml akuades, 0.2 ml tirosin standar (5mM), dan 0.2 ml enzim kasar dalam CaCl_2 (2mM). Ketiga tabung diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 30 menit pada perbedaan suhu 25, 35, 45, 55°C. Selanjutnya ketiga tabung ditambah 2 ml TCA (0.1M). Kemudian larutan CaCl_2 (2mM) sebanyak 0.2 ml dimasukkan ke dalam tabung sampel, sedangkan tabung blanko dan standar masing-masing diberi 0.2 ml enzim kasar dalam CaCl_2 (2mM). Ketiga tabung didiamkan pada suhu 37° C selama 10 menit, lalu diputar dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 1.5 ml filtrat diambil dari ketiga tabung dan ditambahkan 5 ml Na_2CO_3 (0.4 M) untuk mendapatkan pH sekitar 11,5 sebagai pH optimum dalam mempertahankan intensitas dan stabilitas warna biru dan 1 ml reagen Folin Ciocalteu yang akan bereaksi dengan tirosin dan triptofan yang telah larut dalam filtrat dan membentuk kompleks warna biru (lampiran 4, gambar e). Reaksi didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm.

Setiap sampel yang akan dihitung aktivitasnya memiliki nilai absorbansi untuk blanko, standar dan sampel masing-masing. Dengan menggunakan rumus di bawah ini dapat dihitung unit aktivitas dari enzim. Perhitungan aktifitas enzim protease dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Ferdian, 2006):

$$PU = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times P \times 1/T$$

Keterangan; PU : Unit aktivitas protease (unit)

Asp : Nilai absorbansi sampel

Ast : Nilai absorbansi standart

Abl : Nilai absorbansi blanko

P : Faktor pengenceran

T : Waktu inkubasi enzim

Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per ml ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya ml enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μ mol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Baehaki, 2011).

3.5.6 Analisa Data

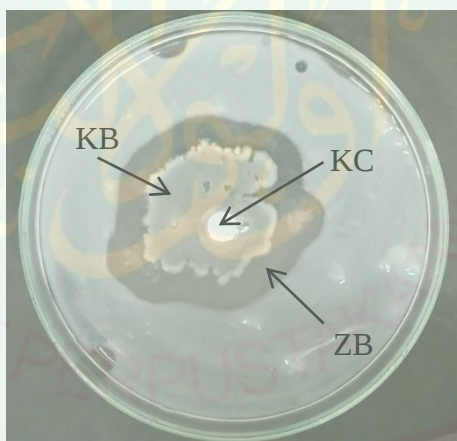
Untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap besarnya nilai aktivitas protease, digunakan rancangan penelitian berupa rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yaitu suhu dan pH. Data pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas protease dianalisis dengan menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA). Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter maka dilanjutkan dengan *Uji Duncan Multiple Test* (DMRT).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Aktivitas Enzim Protease yang Dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* secara Kualitatif

Potensi bakteri endofit *Bacillus subtilis* dalam menghasilkan enzim protease ekstraseluler secara kualitatif dapat diketahui berdasarkan ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri pada media SMA (*Skim Milk Agar*) (Gouda, 2006). Aktivitas protease *Bacillus subtilis* pada media SMA diukur menggunakan indeks protease (IP) yakni dengan membandingkan antara diameter zona bening di sekitar koloni dengan diameter koloni bakteri (Soeka dan Sulistiani, 2014). Hasil pengamatan zona bening dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diuji pada media SMA ditampilkan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Petri dengan media SMA menunjukkan zona bening yang dihasilkan dari aktivitas enzim protease bakteri *Bacillus subtilis* (KB = Koloni Bakteri, ZB = Zona Bening, KC = Kertas Cakram)

Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri (gambar 4.1) menandakan adanya aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis*. Enzim protease yang dihasilkan dapat mengkatalis pemutusan

ikatan peptida pada protein susu dalam media SMA menjadi peptida-peptida rantai pendek dan asam-asam amino yang menyebabkan perubahan warna susu menjadi tidak berwarna atau bening (Milala *et al*, 2016). Nilai indeks protease (IP) yang dihasilkan *Bacillus subtilis* yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C yakni sebesar 1,44 dari hasil perbandingan diameter zona bening (54,21 mm) dengan diameter koloni bakteri (37,65 mm). Menurut Kosim (2010), *Bacillus subtilis* memiliki masa pertumbuhan yang cepat, sehingga diperkirakan dalam waktu 24 jam bakteri ini telah mencapai fase eksponensial. Selain itu suhu 37 °C merupakan suhu yang optimum bagi sebagian besar bakteri.

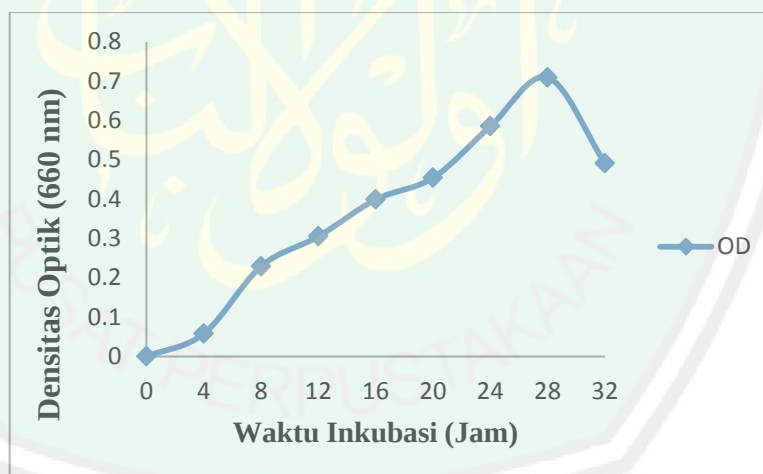
Hasil indeks aktivitas protease *Bacillus subtilis* ini cukup tinggi jika dibandingkan dengan indeks protease isolat T1S1 sebesar 1,1 (Baehaki, 2011). Namun, lebih kecil jika dibandingkan dengan indeks protease *Bacillus mycoides* sebesar 1,79 (Fatchah, 2011). Hal ini dikarenakan bahwa spesies yang berbeda dapat memiliki kemampuan yang berbeda pula dalam menghasilkan protease ekstraseluler yang dapat menghidrolisis kasein dalam media susu skim agar.

4.2 Pola Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Lama waktu fermentasi bakteri *Bacillus subtilis* dalam memproduksi enzim protease yang tinggi dan maksimal dapat diketahui dari fisiologi pertumbuhan bakteri yakni dengan membuat kurva pertumbuhan bakteri. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* bertujuan untuk menentukan waktu saat mikroba memasuki akhir fase logaritmik awal fase stasioner. Sehingga kurva pertumbuhan ini hanya dengan mengukur kekeruhan media menggunakan spektrofotometer tanpa menghitung jumlah mikroba yang sebenarnya. Dalam hal ini tidak hanya sel mikroba yang terukur, namun molekul

besar yang berada dalam media dapat terukur ketika terkena sinar. Sehingga kurva pertumbuhan ini hanya dapat dijadikan acuan untuk mendapatkan titik waktu dari tiap fase pertumbuhan mikroba. Menurut Susanti (2003), kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh, berkembang, memperbanyak diri, dan mensekresikan enzim ke media kultur.

Pembuatan kurva pertumbuhan dan produksi enzim protease dari bakteri *Bacillus subtilis* ini memanfaatkan media campuran limbah cair tahu dan dedak. Limbah cair tahu dan dedak yang digunakan berasal dari pabrik pembuatan tahu dan pabrik penggilingan beras di Kecamatan Sukun, Kota Malang. Berdasarkan hasil penelitian Naiola dan Widhyastuti (2002), media campuran limbah cair tahu dan dedak dapat digunakan sebagai media produksi enzim protease dengan nilai aktivitas protease sebesar $17,61 \times 10^{-2}$ U/ml.



Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis* dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak

Hasil kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada media campuran limbah cair tahu dan dedak (gambar 4.2) menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* melakukan adaptasi pada fase *lag* $\pm$ 4 jam. Waktu adaptasi ini terbilang singkat. Hal ini serupa dengan hasil penelitian Kosim (2010) bahwasanya fase *lag* *Bacillus*

subtilis yakni ± 4 jam. Sedangkan pada kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* yang dilakukan oleh Susanti (2003) fase *lag*nya hanya ± 2 jam. Pada fase adaptasi ini terjadi sintesis enzim oleh sel yang dipergunakan untuk metabolisme metabolit. Setelah mengalami fase adaptasi, sel mulai membelah dengan kecepatan yang sangat rendah karena baru selesai tahap penyesuaian diri. Fase ini disebut fase pertumbuhan awal.

Pada jam ke-4 hingga jam ke-28 laju pertumbuhan bakteri mulai meningkat hingga mencapai titik maksimal dan terjadi pertumbuhan secara logaritmik atau eksponensial. Oleh karena itu, fase ini dinamakan fase *log*. Menurut Kosim (2010), fase *log* merupakan fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial, sehingga kebutuhan energi bakteri *Bacillus subtilis* pada fase ini lebih tinggi dibandingkan fase lainnya. Bakteri banyak memproduksi zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya salah satunya adalah enzim protease. Maka dari itu, produksi enzim protease dilakukan pada akhir fase logaritmik awal fase stasioner yakni pada jam ke-28. Dikarenakan pada fase ini pertumbuhan bakteri mengalami peningkatan dan sangat efektif dalam mensintesis enzim protease secara maksimal (Sulistyaningtyas, et al., 2013). Selain itu Ward (1983) menyatakan bahwa pembentukan enzim protease mulai meningkat memasuki fase eksponensial dan meningkat lebih cepat ketika akan memasuki fase stasioner.

Kerapatan optik mulai mengalami penurunan setelah jam ke-28. Fase penurunan ini menunjukkan bakteri *Bacillus subtilis* dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak mulai memasuki fase kematian atau fase stasioner.

Kematian ini terjadi karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah tertimbun menjadi produk-produk penghambat dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya.

Berbagai jenis bakteri memiliki pola pertumbuhan yang tidak selalu sama. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan khusus pada masing-masing jenis dalam memperoleh makanan dan nutrisi yang berbeda-beda yang jika dikaitkan secara implisit dengan firman Allah dalam Al-Qur'an surat Al-A'la (87) ayat 2-3 yang berbunyi:

الَّذِي خَلَقَ فَسَوَّىٰ ۖ وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ ۖ

Artinya: *“Yang menciptakan dan menyempurnakan (penciptaan-Nya), dan Yang menentukan kadar (masing-masing) dan memberi petunjuk”*(Q.S Al-A'la: 2-3).

Menurut tafsir Ibnu Katsir (2003), maksud dari kedua ayat tersebut yakni Allah menciptakan makhluk dan menyempurnakannya dengan bentuk yang sebaik-baiknya, serta memberikan kemampuan makhlukNya sesuai dengan kadar kebutuhannya masing-masing.

Kemampuan hidup bakteri dalam suatu media tergantung pada ketersediaan nutrisi yang dibutuhkannya. Dalam hal ini, bakteri akan menghidrolisis senyawa kompleks seperti protein menjadi senyawa yang lebih sederhana. Kemampuan bakteri ini merupakan suatu petunjuk bagi manusia atas kebesaran Allah dalam menciptakan makhlukNya.

4.3 Pengaruh Interaksi Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease

Enzim merupakan suatu protein yang mempunyai aktivitas biokimia sebagai katalis suatu reaksi. Enzim sangat rentan terhadap kondisi lingkungan karena enzim merupakan protein. Apabila terdapat perubahan temperatur ataupun derajat keasamaan pada lingkungannya dapat mempengaruhi aktivitas enzim

(Hamdiyati, 2001). Beberapa parameter yang dapat diukur dalam penentuan waktu panen enzim yaitu kerapatan (*optical density*) dan aktivitas enzim yang dihasilkan dalam hal ini adalah enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak. Aktivitas enzim dapat didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum (Lehninger, 1993). Penentuan aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* dilakukan dengan variasi suhu dan pH untuk mendapatkan suhu dan pH optimum.

Adanya pengaruh suhu, pH, dan interaksi antara keduanya terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak diketahui dengan menggunakan analisis statistik berupa ANOVA (*Analysis Of Variance*), sebagaimana ditampilkan pada lampiran 3 tabel 3. Hasil analisis ANOVA pada tabel 3 menunjukkan bahwa nilai dari F hitung ($11,867$) $>$ F tabel 5% ($2,51$) yang berarti ada pengaruh interaksi antara suhu dan pH terhadap aktivitas protease yang dihasilkan *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak.

Selanjutnya, untuk mengetahui perlakuan terbaik dari masing-masing perlakuan dilakukan uji lanjut menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada tabel 4.1. Berdasarkan hasil uji DMRT bahwa notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan pengaruh yang nyata antar perlakuan terhadap aktivitas enzim.

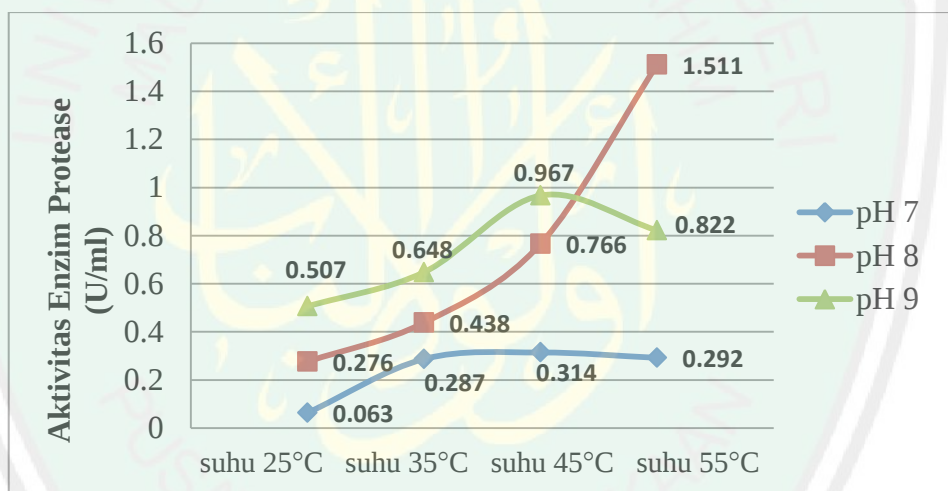
Tabel 4.1 Uji DMRT Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Protease

No	Suhu	pH	Aktivitas Enzim (U/ml)	Notasi
1	25°C	7	0.063	a
2		8	0.276	ab
3		9	0.507	bc
4	35°C	7	0.287	ab
5		8	0.438	bc
6		9	0.648	cd
7	45°C	7	0.314	ab
8		8	0.766	de
9		9	0.967	e
10	55°C	7	0.292	ab
11		8	1.511	f
12		9	0.822	de

Hasil uji lanjut DMRT pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease tertinggi dari *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak yakni pada perlakuan interaksi suhu 55°C dan pH 8 sebesar 1,511 U/ml. Adapun hasil ini berbeda nyata dengan semua perlakuan yang diuji diikuti dengan notasi f (tabel 4.1). Sedangkan, aktivitas enzim protease terendah didapatkan pada perlakuan interaksi suhu 25°C dan pH 7 sebesar 0,063 U/ml. Hasil ini tidak berbeda nyata pada semua perlakuan interaksi pH 7 dengan suhu yang berbeda-beda (35°C, 45°C, dan 55°C). Tidak berbeda nyata pula pada perlakuan interaksi suhu 25°C dan pH 8 yakni dengan nilai aktivitas sebesar 0,276 U/ml.

Aktivitas enzim protease yang dihasilkan *Bacillus subtilis* untuk pH 7 yaitu mengalami peningkatan aktivitas secara berkala dan mencapai optimum pada suhu 45°C sebesar 0,314 U/ml. Kemudian pada suhu 55°C mengalami penurunan aktivitas menjadi 0,292 U/ml. Hal yang sama juga dialami pada aktivitas pH 9 (Gambar 4.3). Dimana pada pH 9 peningkatan aktivitas mencapai

optimum pada suhu 45°C sebesar 0,967 U/ml dan mengalami penurunan pada suhu 55°C dengan nilai aktivitas sebesar 0,822 U/ml. Hal ini menurut Kosim (2010), disebabkan oleh peningkatan energi kinetik akibat suhu yang semakin tinggi, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat dan produk yang dihasilkan meningkat. Selain itu, peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim, karena enzim mengalami denaturasi atau perubahan konformasi enzim pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim.



Gambar 4.3 Grafik Pengaruh Interaksi Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* yang Ditumbuhkan dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak

Aktivitas protease *Bacillus subtilis* pada pH 8 dengan suhu 25°C sebesar 0,276 U/ml dan mengalami peningkatan terus-menerus pada suhu 35°C, 45°C, hingga 55°C dengan masing-masing aktivitas berturut-turut sebesar 0,438 U/ml, 0,766 U/ml, dan 1,511 U/ml. Peningkatan aktivitas seiring dengan kenaikan suhu ini menurut Palmer (1991), dikarenakan akan meningkatkan kecepatan reaksi

kimia yang mempercepat gerak termal molekul, sehingga terjadi peningkatan energi untuk memasuki keadaan transisi.

Peningkatan suhu pada reaksi enzim mempunyai dua pengaruh yaitu dapat meningkatkan laju reaksi atau dapat meningkatkan laju inaktivasi enzim. Semua enzim bekerja dalam rentang suhu tertentu pada tiap jenis organisme (Poedjiaji dan Supriyanti, 2006). Umumnya, setiap peningkatan suhu sebesar 10°C diatas suhu minimum akan menyebabkan peningkatan aktivitas enzim sebanyak dua kali lipat hingga mencapai optimum, namun laju inaktivasi akan meningkat 64 kali lipat (Bintang, 2010).

Selain suhu, faktor lain yang mempengaruhi dalam aktivitas protease *Bacillus subtilis* yang diuji adalah pH. Aktivitas protease pada pH 8 dan pH 9 menunjukkan aktivitas lebih besar dibandingkan dengan aktivitas pada pH 7. Namun, pada grafik (gambar 4.3) menunjukkan bahwa aktivitas optimum pada pH 8 dengan suhu 55°C. Menurut North (1982), Berdasarkan pH optimumnya, protease diklasifikasikan pada protease asam, netral, dan alkalin. Rentang pH 8-12 dapat diklasifikasikan sebagai protease alkalin. Oleh karena itu, enzim protease yang dihasilkan *Bacillus subtilis* ini merupakan protease alkalin yang optimum pada pH basa. Enzim menyediakan tempat untuk pengikatan proton karena enzim adalah protein yang tersusun oleh asam amino yang dapat mengikat proton pada gugus amino, karboksil, dan gugus fungsional lainnya (Suhartono, 1989). Gugus fungsional pada sisi aktif enzim yang dapat terionisasi memegang peranan penting pada suatu reaksi yang dikatalis oleh enzim. Gugus fungsional dapat berada pada asam amino basa dan asam amino asam (Whittaker, 1994). Pada penelitian ini, dalam kondisi lingkungan basa gugus fungsional asam amino pada sisi aktif

protease dapat terionisasi, sehingga enzim dan substrat dapat berikatan dan bereaksi.

Derajat keasaman (pH) lingkungan mempengaruhi kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu enzim yang disebabkan oleh konsentrasi ion H^+ dalam mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum, dimana pada pH tersebut pengikatan substrat oleh struktur tiga dimensi enzim terjadi secara kondusif. Namun apabila konsentrasi ion H^+ berubah dari konsentrasi optimal, maka aktivitas enzim akan hilang secara progresif hingga akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1997). Dengan kata lain, rendahnya aktivitas protease pada pH 7 disebabkan oleh adanya perubahan struktur tiga dimensi protease, sehingga protein tidak dapat berikatan dengan sisi aktif protease.

Sintesis enzim ekstraseluler secara tidak langsung dipengaruhi oleh pH media. Sintesis enzim ekstraseluler terjadi pada membran sel dalam bentuk precursor yang tidak aktif dan akan dilepaskan pada media menjadi bentuk aktif melalui proses proteolisis. Jika pH medium tidak mendukung permeabilitas membran untuk mensekresikan enzim, maka konsentrasi ekoenzim dalam media akan rendah, walaupun enzim telah disintesis pada membran (Ward, 1983).

Berdasarkan nilai aktivitas keseluruhan perlakuan, interaksi suhu $55^{\circ}C$ dan pH 8 merupakan aktivitas protease tertinggi yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* dari tanaman kenikir (*Cosmos sulphureus*) dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak dibandingkan dengan perlakuan interaksi yang lain. Hal ini disebabkan karena pada pH optimum, protease dari *Bacillus subtilis* memiliki konformasi sisi aktif yang sesuai dengan substrat sehingga dapat

membentuk kompleks enzim-substrat yang sesuai sehingga menghasilkan aktivitas yang maksimal. Selain itu juga menurut Palmer (1991), dalam kondisi suhu optimum dapat meningkatkan energi kinetik yang dapat mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi balik enzim maupun substrat, sehingga memperbesar peluang reaksi enzim dengan substrat. Tumbukan yang sering terjadi antara enzim dan substrat ini akan membentuk kompleks produk enzim-substrat yang menyebabkan produk yang terbentuk juga banyak.

Hasil penelitian oleh Soeka dan Sulistiani (2014) menyebutkan bahwa aktivitas protease *Bacillus subtilis* A₁ InaCC B398 yang diisolasi dari Terasi Samarinda dalam media sintetik optimum pada pH 8,5 dan suhu 50°C sebesar 88,4 U/ml. Aktivitas protease *Bacillus subtilis* oleh Milala (2016) optimum pada interaksi pH 8 dan suhu 60°C dengan nilai aktivitas sebesar 0,0827 U/ml dalam media sintetik, sedangkan pada penelitian Pant, *et al* (2015) protease *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari tanah dalam media gelatin optimum pada pH 7,4 sebanyak 143,3 U/ml. Dari beberapa hasil penelitian tersebut dapat diartikan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* optimum pada pH basa dan optimum pada suhu yang relatif tinggi. Hal ini disebabkan bahwa *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang dapat tumbuh baik pada pH basa (alkalin) (Sathiya, 2013) dan dapat pula bertahan hidup pada suhu tinggi dengan rentang 40-60°C atau disebut bakteri termotabil (Thakur dan Tiwari, 2013).

Tingginya aktivitas protease yang dihasilkan oleh Soeka dan Sulistiani (2014) dan Pant, *et al* (2015), selain dari kandungan protein yang tinggi pada masing-masing media sintetik susu skim (37%) (Wilson, 2005) dan gelatin (75,13%) (Prihardhani dan Yunianta, 2016), juga karena adanya penambahan ion

logam sebagai aktivator enzim pada perlakuan Soeka dan Sulistiani (2014) seperti CaCl_2 dan MnCl_2 , serta adanya penambahan sumber nitrogen dan sumber karbon pada perlakuan Pant, et al (2015). Oleh karena itu, terjadi kombinasi kondisi lingkungan yang sangat baik dan sesuai untuk meningkatkan aktivitas protease dalam menghidrolisis protein pada media. Sebagaimana menurut Whittaker (1994) bahwa adanya aktivator yang berikatan dengan enzim dapat menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim.

Hasil aktivitas protease terendah dari keseluruhan perlakuan yakni pada interaksi suhu 25°C dan pH 7 sebanyak 0,063 U/ml. Meskipun bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diuji dalam penelitian ini diisolasi dari tanaman kenikir yang berasal dari dataran tinggi dengan kisaran suhu $22\text{--}28^\circ\text{C}$, namun tidak mempengaruhi aktivitas optimum yang dihasilkan. Hal ini dibuktikan dari hasil aktivitas protease *Bacillus subtilis* yang optimum pada suhu tinggi yaitu 55°C dibandingkan dengan suhu 25°C . Menurut Baehaki (2011), pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum, aktivitas enzim juga rendah. Hal ini disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia yang dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik dari molekul enzim maupun dari molekul substrat.

Pada media yang sama yaitu media campuran limbah cair tahu dan dedak, hasil aktivitas protease dari *Bacillus mycoides* optimum pada suhu 60°C dan pH 8 sebesar 0,2759 U/ml (Noviasari, 2013) dan aktivitas protease *Bacillus macerans* pada pH 7 dan suhu 37°C sebesar 0,1761 U/ml (Naiola dan Widhyastuti, 2002). Hasil kedua aktivitas protease *Bacillus mycoides* dan *Bacillus macerans* tersebut lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas protease *Bacillus subtilis* yang diuji.

Selain itu, pada aktivitas protease *Bacillus mycoides* memiliki pH optimum yang sama dengan *Bacillus subtilis* yaitu pH 8, akan tetapi suhu optimum dan besarnya aktivitas protease berbeda. Hal ini menandakan bahwa setiap spesies bakteri memiliki batas toleransi tertentu terhadap parameter lingkungan tertentu. Fleksibilitas mikroba dalam beradaptasi pada lingkungan yang berbeda terlihat ekspresi genetik yang berubah. Bakteri proteolitik yang berhasil bertoleransi dengan lingkungan akan menghasilkan aktivitas enzim protease tertinggi (Sumardi, 2009).

Bacillus licheniformis memiliki aktivitas protease tertinggi sebesar 123,34 U/ml pada suhu 50 dan 193,14 U/ml pada pH 10 (Yati, 2011). Aktivitas protease *Bacillus firmus* dan *Bacillus cereus* yang diisolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto berturut-turut adalah 0,487 U/ml dan 0,691 U/ml (Saidah, 2014). Protease dari isolat T1S1 dan T2S3 yang diisolasi dari tanah rawa Indralaya memiliki aktivitas optimum masing-masing 0,391 U/ml dan 0,385 U/ml pada pH 8, sedangkan isolat T3S3 optimum pada pH 7,5 (Baehaki, 2011). Nilai aktivitas protease yang berbeda-beda menunjukkan bahwa bakteri memiliki potensi yang bervariasi dalam memanfaatkan nutrisi dari substrat maupun kemampuan metabolismenya seperti jumlah enzim dan asam amino yang dimiliki masing-masing bakteri berbeda, sehingga akan beradaptasi pada kondisi yang paling sesuai dengan kebutuhan metabolismenya (Agustien, 2010). Allah berfirman dalam Q.S Al-Furqaan (25) ayat 2 yang berbunyi:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya: “Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya”. (Q.S Al Furqaan: 2)

Penggalan ayat yang digaris bawahi tersebut menjelaskan bahwa Allah telah menetapkan dari apa yang diciptakan-Nya sesuai dengan hikmah yang diinginkan-Nya dan bukan karena nafsu dan kelalaian, melainkan segala sesuatu berjalan berdasarkan ketentuan-Nya (Al-Qurthubi, 2008).

Firman Allah SWT dalam Q.S Al-Hijr (15) ayat 20 juga menerangkan tentang keberadaan enzim dan potensinya dalam kehidupan bukan semata-mata kebetulan, melainkan tanda kemurahan Allah terhadap makhluk-makhlukNya. Yang demikian ini dapat dikaitkan dalam firman-Nya yang berbunyi:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ ﴿٢٠﴾

Artinya: “Dan Kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (Kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezeki kepadanya”. (Q.S Al-Hijr: 20)

Allah SWT telah menjadikan keperluan-keperluan hidup manusia berupa buah-buahan dan biji-bijian sebagai rezeki bagi makhluk-Nya (Al-Qurthubi, 2008).

Rezeki yang diberikan Allah sangatlah lengkap. Berbagai sumber kehidupan baik makro maupun mikro telah Allah karuniakan kepada makhluk-Nya. Seperti halnya enzim protease yang dibutuhkan oleh setiap makhluk hidup dalam proses metabolisme. Enzim protease dapat diperoleh dari tanaman, hewan, dan mikroba. Enzim protease yang dihasilkan dari mikroba merupakan bentuk rezeki yang Allah berikan untuk membantu memenuhi keperluan-keperluan hidup

manusia. Salah satunya adalah enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* dari tanaman Kenikir yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak.

Pemanfaatan media alternatif limbah cair tahu dan dedak ini juga sangatlah perlu dilakukan. sebagaimana menurut Fardiaz (1988) bahwa dalam industri fermentasi dibutuhkan substrat yang murah, mudah didapat, dan penggunaannya yang efisien. Selain itu, media yang digunakan harus dapat memenuhi kebutuhan senyawa karbon, nitrogen serta beberapa zat pertumbuhan yang diperlukan, misalnya asam amino esensial. Oleh karena itu, media campuran limbah cair tahu dan dedak ini merupakan media yang cukup potensial untuk digunakan sebagai media alternatif dalam produksi enzim protease. Sebagaimana diketahui bahwa kandungan protein yang cukup tinggi (40-60%) dalam limbah cair tahu (Sugiharto, 2010) serta kandungan nitrogen (34,2-46,1%) dalam dedak.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* dari tanaman kenikir (*Cosmos sulphureus*) yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak yakni memperoleh aktivitas protease tertinggi pada perlakuan suhu 55°C dan pH 8 sebesar 1,511 U/ml, sedangkan aktivitas protease terendah diperoleh pada perlakuan suhu 25°C dan pH 7 sebesar 0,063 U/ml.

5.2 Saran

Penelitian ini perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menambahkan variabel yang diamati seperti konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, aktivator, dan inhibitor yang mempengaruhi aktivitas enzim, serta dilakukan pemurnian enzim dan pemanfaatan aplikatifnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., dkk. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm Scitech* 4: 56-59.
- Ad-Dimasyqi, Al-Imam Abul Fida Isma'il Ibnu Katsir. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 3*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Ad-Dimasyqi, Al-Imam Abul Fida Isma'il Ibnu Katsir. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Ad-Dimasyqi, Al-Imam Abul Fida Isma'il Ibnu Katsir. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 7*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Ad-Dimasyqi, Al-Imam Abul Fida Isma'il Ibnu Katsir. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 8*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Agustien, N. 2010. *Hubungan Antara Asupan Protein dengan Kekurangan Energi Kronik pada Ibu Hamil*. Surakarta: USM.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkali Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah* 9 (2).
- Al-Mahalli, I.J., dan As-Suyuti, I.J. 2008. *Tafsir Jalalain Jilid 2*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Al-Qarni, 'Aidh. 2007. *Tafsir Muyassar Jilid 2*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi Jilid 7*. Jakarta: Pustaka Azam.
- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi Jilid 10*. Jakarta: Pustaka Azam.
- Amelia, Aam. 2012. Pengaruh Variasi Konsentrasi Enzim dan Substrat Terhadap Sakarifikasi Limbah Pengolahan Kertas Menggunakan Enzim Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK2. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Program Studi Farmasi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Asy-Syanqithi, Syaikh. 2006. *Tafsir Adhwa'ul Bayan Jilid 1*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Asy-Syaukani. 2008. *Tafsir Fathul Qadir*. Terjemahan Amir Hamzah Fachruddin. Jakarta : Pustaka Azzam.

- Ath-Thabari Abu Ja'far Muhammad bin jarir. 2007. *Tafsir Ath-Thabari Jilid 1*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Atlas, R.M dan R. Bartha 1987. *Microbial Ecology, Fundamentals and Application*, 2nd sdition. California: The Benjamin/ Cumming publishing Company, Inc. Menlo Par.
- Aunstrup, K. 1979. Production Isolation and Economic of Ekstracellular Enzyme. *Appli. Biochem and Bioeng*. Vol. 2. Academic.
- Backman PA, Sikora RA. 2008. Endophytes: an Emerging Tool for Biological Control. *Biol Control*. 46(1):1-3.
- Baehaki A., dkk. 2005. Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen Ikan *Aeromonas hydrophilla*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 8(2):60-72.
- Baehaki A., dkk. 2008. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 19(1): 80-86.
- Baehaki, A., dkk. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Indralaya, Sumatera Selatan. *Teknologi dan industri pangan*. Vol.XXII. No. 1.
- Bahreisy, H. 1988. *Terjemahan Singkat Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4*. Kuala Lumpur: Victory Agencie.
- Bergmann, M. 1942. A Classification of Proteolytic Enzymes. *Adv. Enzymol*.
- Bergmeyer, H.U dan Grassal, M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed.ke-2. Weinheim: Verlag Chemie.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Boyer, P. D. 1971. *The Enzymes*. 3rd ed. New York: Academic Press. Inc.
- BPPT. 2013. *PT Petrosida Gresik Gandeng BPPT untuk Membangun Indusrti Enzim*. [http://www.bppt.go.id/index.php/teknologi-agroindustri dan bioteknologi/1784](http://www.bppt.go.id/index.php/teknologi-agroindustri_dan_bioteknologi/1784). Diakses pada tanggal 22/09/13.
- Cappucino, J.G dan Sherman N. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing.
- Cartwright, Peter. 2009. Probiotic News: *Bacillus subtilis* – Identification and Safety. *Protexin Health Care*. No: 2
- Chaplin, M. F dan C Bucke.1990. *Enzyme Technology*. Great Britain: Cambridge University Press, Cambridge.

- Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J., Hyde, K.D. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea javanica*. *J Agric Tech*. 1: 55-66.
- Chu, W.H. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 34:241-245.
- Doi, R.H dan M. Martina. 1992. *Biology of Bacillus*. Stoneham : Butterworth-Heinemann Stoneham.
- Fatichah, N.F.Y. 2011. Potensi Bakteri Endofit Sebagai Penghasil Enzim Kitinase, Protease dan Selulase Secara In Vitro. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: PAU- IPB.
- Ferdian, H. 2006. Potensi Protease *Bacillus subtilis* nato Sebagai Pengempuk Daging. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor : ITB.
- Federer WT. 1967. *Experimental Design, Theory and Application*. Oxford and IBH Publ. Co, New Delhi.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Fowler, M.W. 1988. *Enzyme Technology*. Di dalam A. Scragg (ed.). *Biotechnology for Engineers*. England: Ellis Horwood Ltd.
- Fuad, A.M., dkk. 2004. Produksi dan Karakterisasi Parsial Protease Alkali Termotabil *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01. *J. Mikrobiol. Indones*. 9 (1) : 29-35.
- Fujiwara, N dan Yamamoto K. 1987. Production of Alkaline Protease in Low-cost Medium by Alkalophilic *Bacillus* sp. and Properties of The Enzyme. *Ferment Technol* .65: 345-348.
- Gordon, R.E. 1981. *The Genus of Bacillus*. Di dalam A. I. Lanskin dan H.A. lechevalier (ed). *Handbook of Microbiology*. New Jersey: CRE Pres.
- Gouda, M.K. 2006. Optimization and Purification of Alkaline Proteases Produced by Marine *Bacillus* sp. MIG Newly Isolated from Eastern Harbour of Alexandria. *Polish Journal of Microbiology*. 55 (2): 119-126.
- Grata, K., dkk. 2010. Evaluation of Proteolytic Activity of *Bacillus mycoides* Strains. Opole: Independent Department of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole. *Proceedings of ECOpole*. Vol 4, no 2.
- Gunawan, C. 1975. Percobaan Membuat Inokulum Untuk Tempe dan Oncom. *Makalah Ceramah Ilmiah LKN*. Bandung: LIPI.

- Gupta, R., Beg, Q.K., dan Lorenz, P. 2002. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59:15-32.
- Gusnimar. 2011. Pengaruh Penambahan Dedak dan Lama Pelapukan Media Limbah Industri Teh Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus* l.). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Padang: Universitas Andalas.
- Hamdiyati, Y. 2001. Pertumbuhan dan Pengendalian Mikroorganisme. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Hames, D., dan Hooper, N. 2005. *Biochemistry*. Ed-4. New York: Taylor and Francis Group.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, J.T., Williams, S.T. 2004. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Edisi ke 9*. Philadelphia: lippincott Williams & Wilkins. A. Wolters Company.
- Houston DF, 1972. Rice bran and polish. Dalam: *Rice Chemistry and Technology*, DF Houston (Ed). American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota. (Online). Diakses pada 21 Maret 2017.
- Jakubowski, Henry. 2017. Regulation of Metabolic Pathways: How is Enzyme Activity Regulated?. *Biochemistry Online*. https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Metabolism/MetPathways4_RegEnzActn.ml Diakses pada tanggal 3 Desember 2017 pukul 15.12 WIB.
- Jasmiyati, S dan A. Thamrin. 2010. Bioremediasi Limbah Cair Industri Tahu Menggunakan Efektif Mikroorganisme (EM4). Riau: universitas Riau. *Journal environmental science*: 2.
- Judoamidjojo, M., dkk. 1990. *Teknologi Fermentasi*. Bogor: PAU- bioteknologi IPB.
- Kosim, M.S dan R. Putra. 2010. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. *Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010*. Jurusan Kimia FMIPA. ITS Surabaya.
- Kumar, D dan Bhalla TC. 2004. Purification and Characterization of a Small Size Protease from *Bacillus* sp. APR-4. *Exp Biol* 42: 515-517.
- Lay, B.W dan Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi Edisi ke satu*. Jakarta: Rajawali Press.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia*. Thenawidjaja M, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari : *Principles of Biochemistry*.

- Madigan, M.T, Martiko, J. M. Parker, J. 2012. *Book Biology of Microorganism 10th Edition*. New Jersey: Lentis Hall
- Mangunwidjaja, D dan Suryani A. 1994. *Teknologi Bioproses*. Jakarta: Swadaya.
- Martin, D.W., dkk. 1983. *Harper's Review of Biochemistry. Large Medical Publication*. California.
- Melliawati, Ruth., Rohmattusolihat., Nuryati., Nanik Rahmani., dan Yopi. 2016. Seleksi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Potensial Penghasil Enzim Protease dari Taman Nasional Gunung Halimun. *Biopropal Industri* vol. 7 no.2:73-82.
- Meyrath, J.V.E. 1975. Production of Microbial Enzyme. Di dalam: Reed G, editor. *Enzyme in Food Processing*. New York: Academic Press.
- Milala, M.A., Jatau, I.A., dan Abdulrahman, A.A. 2016. Production an Optimization of Protease from *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis* using Response Surface Methodology. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2 (7): 1-7.
- Moran, L.A., dkk. 1994. *Biochemistry Second Ed*. Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River.
- Mufarrihah, L. 2009. Pengaruh Penambahan Bekatul dan Ampas Tahu Pada Media Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Jamur Tiram Putih. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. UIN Malang.
- Mufarrikha, I., Roosdiana, A., dan Prasetyawan, S. 2014. Optimasi Kondisi Produksi Pektinase dari *Aspergillus niger*. *Kimia Student Journal*. 2 (1) : 393-399.
- Mufidah., Setiyono., Soedrajadjad R. 2015. Peningkatan Hasil dan Kandungan Kalsium Jamur Merang dengan Penambahan Sumber karbon serta Pemanfaatan Serbuk Sabut Kelapa (Cocopeat). *Berkala Ilmiah Pertanian*. xx-xx.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Ed ke-26. San Fransisco: McGraw-Hill.
- Nagodawithana, T. dan G. Reed. 1993. *Enzymes in food processing* 3rd ed. California: Academic press inc.
- Naiola, E dan N. Widhyastuti. 2002. Isolasi, Seleksi, dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi* 6 (3) : 9-16.

- Nakanishi, T., Minamiura, N., and Yamamoto, T. (1974) *Agricultural Biological Chemistry* 38, 37-44
- Nascimento, W.C.A dan Martins M.L.L. 2006. Studies on Stability of Protease from *Bacillus* sp. and its Compatibility with Commercial Detergent, Brazilia, *Microbiol*, 37: 307-311.
- Nelson, D.L., dan Cox, M.M. 2005. *Principles of Biochemistry*. Ed ke4. New York: Worth Publisher.
- Ngilih, Y. 2009. *Biokimia: Struktur dan Fungsi Biomolekuler*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Nisha, N.S., dan Divakaran, J. Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus subtilis* NS isolated from Sea Water. *Academic Journals*. 13 (16): 1707-1713.
- Noviasari, Dian. 2013. Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease *Bacillus mycoides* yang Ditumbuhkan dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Nurkholis, M. 2007. Evaluasi Efek Sinbiotik Isolat Indigenus Asal Bekatul Padi Pada Medium Fermentasi Bekatul Secara Infitro. Malang: UB.
- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzymes*. England : Ellis Horwood.
- Pandy, D. S. 2010. Pemanfaatan Limbah Cair Industri Pengolahan Tahu Untuk Memproduksi Spora *Bacillus Thuringiensis* Serovar Israelensis Dan Aplikasinya Sebagai Biokontrol Larva Nyamuk . Universitas Udayana. PKMT. 2-24-1.
- Panic, Milan. 2017. *MP Biomedicals, LLC*. California. <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02152945&country=223>. Diakses pada tanggal 28 Desember 2017 pukul 22.00 WIB.
- Panji, S., dkk. 2002. Produksi dan Stabilisasi Desaturase dari *Absidia corybifera*. *Majalah Menara Perkebunan*.
- Pant, Gaurav., Anil Prakash., J.V.P. Pavani., Sayantan Bera., G.V.N.S. Deviram., Ajay Kumar., Mitali Panchpuri., Ravi Gyana Prasuna. 2015. Production, Optimization, and Partial Purification of Protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 9: 50–55.
- Pariza, M.W. dan Johnson, E.A. 2001. Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century. *Regulatory Toxology and Pharmacology*. Vol. 33, Hal: 173-186.

- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan, 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Jilid 2, Terjemahan Ratna Sri Hadioetomo, dkk., Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Poedjiadi, A dan T, Supriyanti. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Prihardhani, D.I., dan Yuniarta. 2016. Ekstraksi Gelatin Kulit Ikan Lencam (*Lenthrinus Sp*) dan Aplikasinya untuk Produk Permen Jeli. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 4 (1): 356-366.
- Purbasari, A dan Silviana. 2008. Kajian Awal Pembuatan Biodiesel dari Minyak Dedak Padi dengan Proses Esterifikasi. *Reaktor*, Vol. 12 No. 1.
- Putranto, W.S. 2006. Purifikasi dan Karakterisasi Protease yang Dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam Fermentasi Susu Sapi Perah. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Radiyati, T., dkk. 1992. Pengolahan Kedelai. Subang: BPTTG Puslitbang Fisika Terapan – LIPI.
- Rajasa, H. 2003. *Pidato Pembukaan 3rd Conference on Industrial Enzyme and Biotechnology. Technology and Business Opportunity for Industrial Enzyme in Harmony with Environment*. BPPT. Jakarta, 6-7 Oktober 2003.
- Rao, M,M., dkk. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol And Mol Biol Rev* 62(3):597-635.
- Rheinheimer. 1980. *Aquatic Microbiology*, A. Chichester: willey Inter Science Publication.
- Rizaldi, Rachmat. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik yang Berasosiasi dengan Lamun *Enhalus acoroides* di Pantai Bama, Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur. *Skripsi Tak Diterbitkan*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Sa'id, E.G. 1987. *Bioindustri: Penerapan Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Mediyatama Sarana Perkasa.
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta: Widya Medika.
- Saefudin, A. 2006. *Enzim*. Cibinong: Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI.

- Saidah, Afif Nur. 2014. Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Protease. *Skripsi Tak Diterbitkan*. Malang: UIN Malang.
- Sathiya, G. 2013. Production of Protease from *Bacillus subtilis* and It's Application in Leather making Process. *International Journal of Research in Biothecnology and Biochemistry*. 3 (1): 7-10.
- Setiawan, A., dan Rusdijjati, R. 2014. Peningkatan Kualitas Biogas Limbah Cair Tahu dengan Metode Taguchi. *Prosiding SNATIF Ke-1*. ISBN: 978-602-1180-04-4.
- Shcalbroeck. 2001. Toxicologikal Evalution of Red Mold Rice. DFG- Senate Comision on Food Savety. Ternak monogastrik. *Karya Ilmiah*. Bogor: Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.
- Schallmeyer, M., Singh, A., dan Ward, O.P. 2004. Development tn The Use of Bacillus Species for Industrial Production. *Can J. Microbiology*. Vol: 50. Hal: 1-17
- Soeka, Yati Sudaryati., dan Sulistiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus Subtilis* A1 Inacc B398 yang Diisolasi dari Terasi Samarinda. *Berita Biologi* 13(2): 203-212.
- Stanbury, P.F dan A. Whittaker. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon. Inggris: Press. Ltd Oxford.
- Stanbury, P.F dan Whitaker, A.1987. *Principles of Fermentation Tecnology*. Toronto, Canada.
- Sudaryati. N.L.H., dkk. 2007. Pemanfaatan Sedimen Perairan Tercemar Sebagai Bahan Lumpur Aktif dalam Pengolahan Limbah Cair Industri Tahu. Denpasar: Universitas Udayana. 3 (1) : 21 – 29.
- Sugiharto. 1994. *Dasar-Dasar Pengolahan Air Limbah*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Suhartono, M.T. 2000. *Pemahaman Karakteristik Biokimia Enzim Protease dalam Menunjang Industri Berbasis Bioteknologi*. Buku Orasi Ilmiah Guru Besar Ilmu Dasar-Dasar Biokimia Dasar. Bogor: Fateta IPB.
- Sulastri, S. 2008. *Pemanfaatan Protease Dari Akar Nanas Pada Proses Pembuatan Virgin Coconut Oil (VCO)*, Bandung: ITB

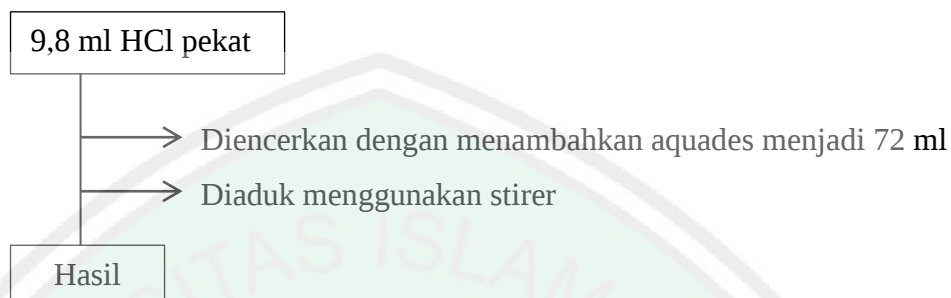
- Sulistyaningtyas, A.S., Prasetyawan, S., dan Sutrisno. 2013. Pengaruh Penambahan Ion Fe^{3+} Terhadap Aktivitas Xilanase Dari *Trichoderma viride*. *Kimia Student Journal*. 2 (2) : 470-476.
- Sumarlin, L.O. 2010. Aktivitas Protease dari *Bacillus circulans* pada Media Pertumbuhan dengan pH Tidak Terkontrol. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Sumarsih, S. 2003. *Diktat Kuliah: Mikrobiologi Dasar*. Yogyakarta: Fakultas Pertanian UPN.
- Suriawiria, U. 1990. *Pengantar Mikroba Umum*. Bandung: Angkasa.
- Susanti, V.H. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. FKIP Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Susanti E. V. H dan S, R.D Ariani. 2003. Kloning Gen Penisilin V Asilase Dari *Bacillus* sp Melalui Pembuatan Pustaka Genom. Program Studi Kimia Jurusan FKIP. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 57125. *Biodiversitas*. Vol 5, no 1 hal 1-6.
- Sutandi C. 2003. Analisis Potensi Enzim Protease Lokal. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Taylor, A.J dan R.M. Leach.1995. *Enzymes in the Food Industry*. Di dalam G. A.
- Thakur, S., dan Tiwari, E. 2013. Isolation and Characterization of Thermostable Protease Producing Bacteria from Soap Industry Effluent. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 6 (2): 50-52.
- Thomas, D.B. 1984. *A Textbook Of Industrial Microbiology*. USA: Sinaver Associates Sunderland.
- Trismilah, R.D., dkk. 2001. Pemanfaatan Limbah Cair Tahu sebagai Medium dan Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan Bakteri Penghasil Enzim Protease. *Prosiding Seminar Keanekaragaman Hayati dan Aplikasi Bioteknologi Pertanian*. Jakarta: BPPT.
- Triyono, S. & Hasanudin, U. 1998. Pengurangan beban pencemaran air limbah industri tahu melalui proses pengurangan kadar minyak kedelai. *Laporan penelitian*. Lampung: Faperta Universitas Lampung
- Udiyono. 1987. Penggunaan Dedak Beras sebagai Bahan Pembuat Enzim. *Symposium Bioproses dalam Industri Pangan*.

- Ummulbalqis, 2006. Karakterisasi Protease dari Ekskretori/Sekretori Stadium L3 *Ascaridia galli*. <http://www.damandiri.or.id/file/ummubalqisipbbab5.pdf>. Diakses 20 Maret 2017.
- Utarti, E, dkk. 2009. Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus* sp 31. *Ilmu Dasar*. (10)1: -
- Ward, O.P. 1985. *Proteolytic Enzyme*. New York: Pergamon.
- Ward, O.P 1983. *Proteinase di dalam Microbial Enzyme And Biotechnology*. W.M. Fogart. *Applied Science Publisher*. New York.
- Wibawani, A.I. 2016. Potensi Bakteri Endofit Asal Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus* cav.) sebagai Antagonis terhadap Penyebab Penyakit Busuk Lunak pada Kentang (*Erwinia carotovora*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Whittaker, J.R. 1994. *Principles of Enzymology for The Food Sciences*. Second Edition. New York : Marcek Dekker Inc.
- Winarno, F.G. 1989. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia.
- Yang JK., IL Shih., YM Tzeng., and SL Wang. 2000. Production and Purification of Protease from a *Bacillus subtilis* that Can Deproteinize Crustacean Wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 406–413.
- Yanus. 1988. Protease dari *Bacillus subtilis* dan Penerapannya sebagai Pengempuk Daging. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Fakultas Teknik Pertanian, IPB.
- Yati, S. S. dkk. 2011. Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam Memproduksi Enzim Protease yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Media Litbang Kesehatan*. Vol. 21, No 2.
- Yun, 2006. Dari Limbah Keluarlah Enzim. <http://www.kompas.com>. Diakses pada Tanggal 13 Februari 2017.
- Yuniati, Rani., Titania T. Nugroho., Fifi Puspita. 2015. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *Jom FMIPA*. 1(2) : 116-122.
- Yuneta, R., dan Putra, S.R. 2010. Pengaruh Suhu pada Lipase dari Bakteri *Bacillus subtilis*. *Prosiding Kimia FMIPA*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Yusriah dan Kuswyasari, Nengah Dwianita. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni POMITS* Volume 2. Nomor 1.

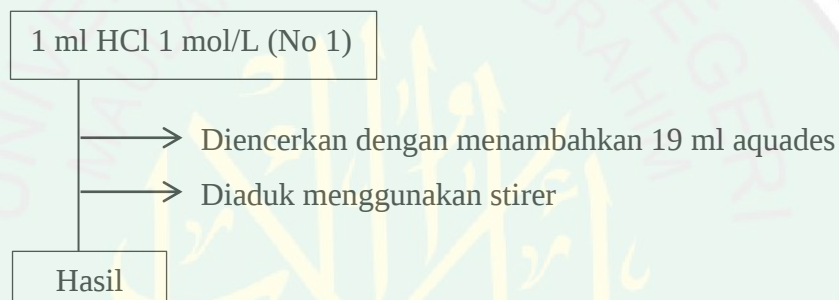
LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Pereaksi Aktivitas Enzim Protease Metode Bergmeyer (1983)

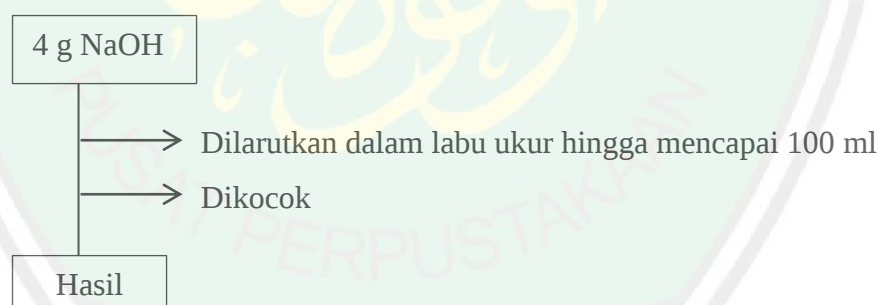
1. Asam klorida (HCl 1 mol/L)



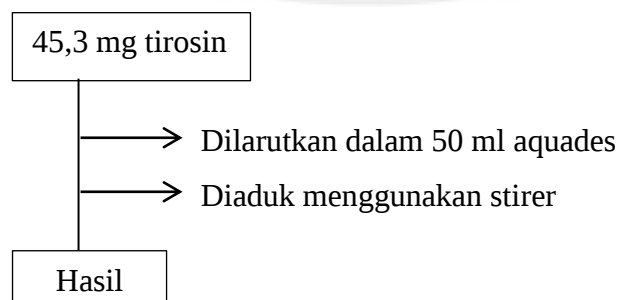
2. Asam klorida (HCl 0.05 mol/L)



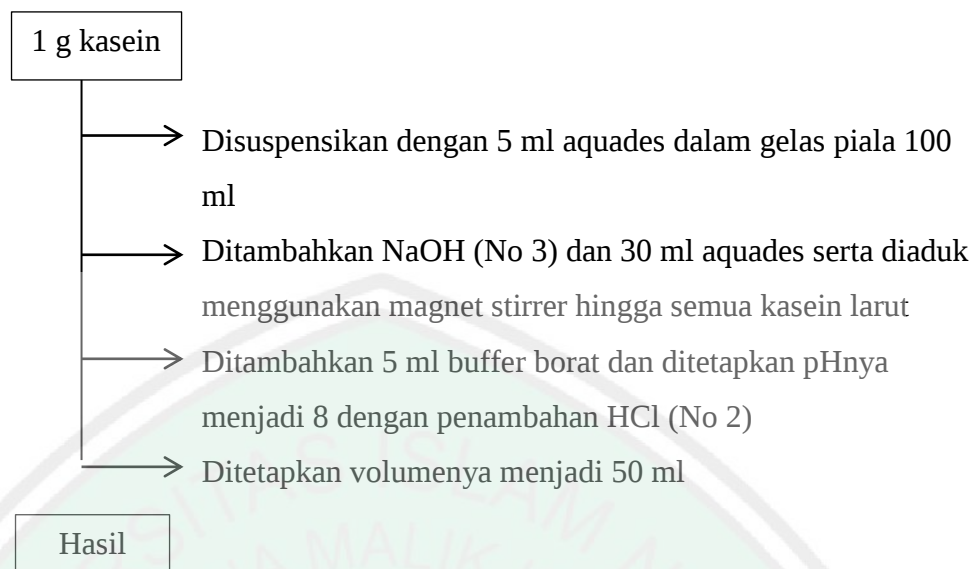
3. Natrium hidroksida (NaOH 1 mol/L)



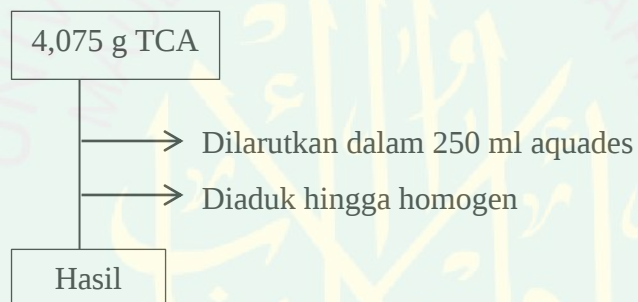
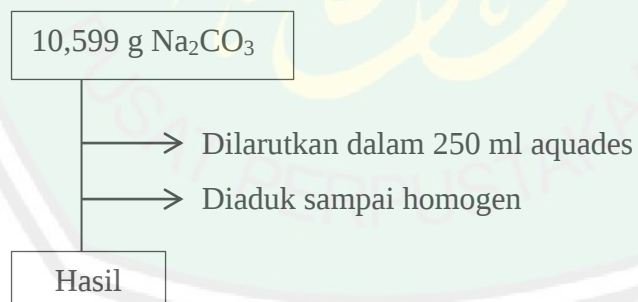
4. Larutan tirosin standar (5 mmol/L)



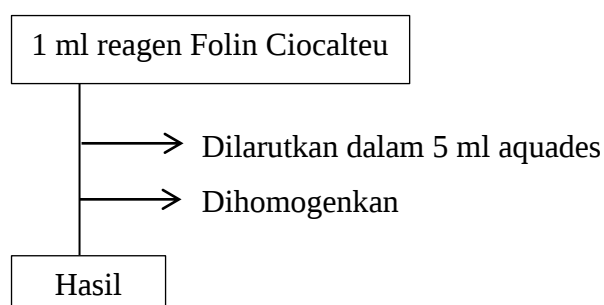
5. Larutan substrat kasein (2% w/v)

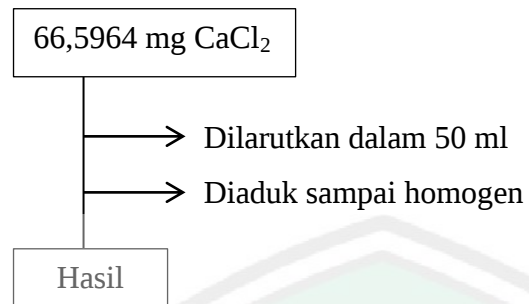
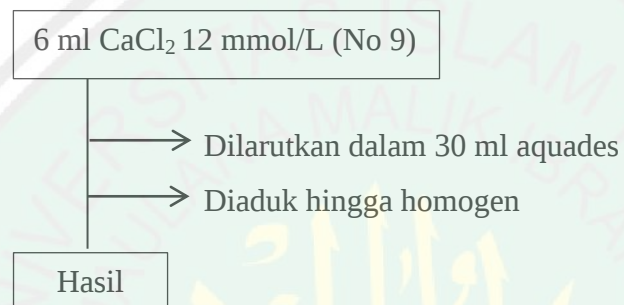


6. Asam Trikloroasetat (TCA 0.1 mol/L)

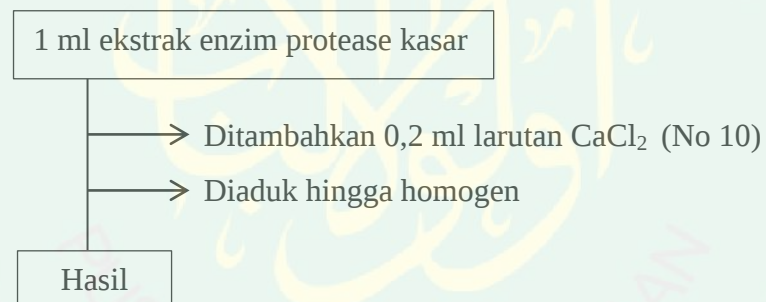
7. Natrium karbonat (Na_2CO_3 0.4 mol/L)

8. Folin Ciocalteu



9. Kalsium klorida (CaCl_2 12 mmol/L)10. Kalsium klorida (CaCl_2 2 mmol/L)

11. Larutan enzim protease



Lampiran 2. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

a. Absorbansi Enzim Protease sebelum Perhitungan

Tabel 1. Data Absorbansi Enzim Protease sebelum Perhitungan

Suhu	pH	Absorbansi Sampel (Asp)			Absorbansi Standart (Ast)	Absorbansi Blanko (Abl)
		Ulangan				
		1	2	3		
25	7	0.098	0.122	0.102	0.155	0.078
	8	0.233	0.187	0.202	0.160	0.088
	9	0.177	0.203	0.189	0.112	0.074
35	7	0.221	0.243	0.32	0.192	0.096
	8	0.537	0.477	0.369	0.254	0.127
	9	0.652	0.812	0.603	0.282	0.141
45	7	0.439	0.379	0.237	0.244	0.122
	8	0.762	0.827	0.678	0.270	0.135
	9	1.006	0.891	1.122	0.296	0.148
55	7	0.788	0.674	0.567	0.492	0.246
	8	0.873	1.264	0.973	0.206	0.103
	9	1.332	0.994	1.003	0.374	0.187

Rumus aktivitas enzim protease metode Bergmeyer dan Grassal (1983) :

$$PU = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times P \times 1/T$$

Contoh perhitungan berdasarkan rumus aktivitas enzim protease diatas:

Diketahui : P = 5 (pengenceran pereaksi Folin Ciocalteu sebanyak 5 kali)

T = 30 menit (waktu inkubasi enzim)

$$\begin{aligned}
 PU &= \frac{0,098 - 0,078}{0,155 - 0,078} \times 5 \times 1/30 \\
 &= 0.260 \times 5 \times 1/30 \\
 &= 0,043 \text{ U/ml}
 \end{aligned}$$

b. Aktivitas Enzim Protease setelah Perhitungan

Tabel 2. Data Aktivitas Enzim Protease setelah Perhitungan

Suhu	pH	Aktivitas Enzim Protease (Unit/ml)			Rata-Rata Aktivitas Enzim Protease (Unit/ml)
		Ulangan			
		1	2	3	
25	7	0.043	0.095	0.052	0.063
	8	0.336	0.229	0.264	0.276
	9	0.452	0.566	0.504	0.507
35	7	0.217	0.255	0.389	0.287
	8	0.538	0.459	0.318	0.438
	9	0.604	0.793	0.546	0.648
45	7	0.433	0.351	0.157	0.314
	8	0.774	0.854	0.670	0.766
	9	0.966	0.837	1.097	0.967
55	7	0.367	0.290	0.217	0.292
	8	1.246	1.879	1.408	1.511
	9	1.020	0.719	0.727	0.822

Lampiran 3. Analisis Data

a. Analisis Varians Aktivitas Enzim Protease

Tabel 3. Analisis Varians Aktivitas Enzim Protease

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F hitung	F tabel 5%	Sig.
Model	5.215 ^a	11	.474	24.421	2.22	.000
Suhu	1.807	3	.602	31.025	3.01	.000
pH	2.026	2	1.013	52.173	3.40	.000
Suhu * pH	1.382	6	.230	11.867	2.51	.000
Error	.466	24	.019			
Total	17.551	36				

b. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease

Tabel 4. Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease

Suhu	N	Subset			
		1	2	3	4
Duncan ^{a,b} suhu 25	9	.28233			
suhu 35	9		.45767		
suhu 45	9			.68211	
suhu 55	9				.87478
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

c. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease

Tabel 5. Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease

pH	N	Subset	
		1	2
Duncan ^{a,b} pH 7	12	.23883	
pH 8	12		.73592
pH 9	12		.74792
Sig.		1.000	.835

d. Interaksi antara suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease

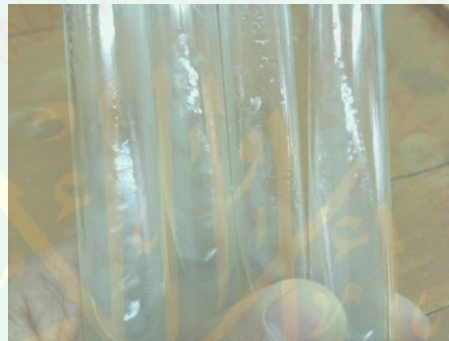
Tabel 6. Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk pengaruh interaksi antara suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease

Interaksi Suhu dan pH	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
T1P1	3	.06333					
T1P2	3	.27633	.27633				
T2P1	3	.28700	.28700				
T4P1	3	.29133	.29133				
T3P1	3	.31367	.31367				
T2P2	3		.43833	.43833			
T1P3	3		.50733	.50733			
T2P3	3			.64767	.64767		
T3P2	3				.76600	.76600	
T4P3	3				.82200	.82200	
T3P3	3					.96667	
T4P2	3						1.5110
Sig.		.058	.084	.093	.160	.107	1.000

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian



Gambar a. Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak



Gambar b. Peremajaan Isolat *Bacillus subtilis* pada media NA miring



Gambar c. Media SMA (*Skim Milk Agar*)



Gambar d. Ekstrak Enzim Protease Kasar



Gambar e. Sampel enzim protease yang telah diberi perlakuan dan akan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933

Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Mamluatul Faizah
NIM : 13620101
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil / Genap TA
Pembimbing : Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
Judul Skripsi : Pengaruh Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Protease *Bacillus subtilis* dari Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) yang Ditumbuhkan dalam Media Campuran Limbah Cair Tahu dan Dedak

NO	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	03-02-2017	Pengajuan Judul Skripsi	1. <i>[Signature]</i>
2.	21-02-2017	ACC Judul Skripsi	2. <i>[Signature]</i>
3.	08-03-2017	Konsultasi BAB I, II dan III	3. <i>[Signature]</i>
4.	27-03-2017	Revisi BAB I, II dan III	4. <i>[Signature]</i>
5.	03-04-2017	Revisi BAB I, II dan III	5. <i>[Signature]</i>
6.	10-04-2017	ACC BAB I, II dan III	6. <i>[Signature]</i>
7.	11-09-2017	Konsultasi Hasil Data Pengamatan	7. <i>[Signature]</i>
8.	03-10-2017	Konsultasi Analisis Data	8. <i>[Signature]</i>
9.	20-11-2017	Konsultasi BAB IV	9. <i>[Signature]</i>
10.	23-11-2017	Revisi BAB IV dan Konsultasi BAB V	10. <i>[Signature]</i>
11.	27-11-2017	Revisi BAB IV dan V	11. <i>[Signature]</i>
12.	15-12-2017	ACC Skripsi	12. <i>[Signature]</i>

Pembimbing Skripsi,

Dr. Hj. Ulfah Utami, M. Si
NIP. 19650509 199903 2 002



Malang, 3 Januari 2018
Ketua Jurusan

Romaidi, M. Si, D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019