

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim Protease

Enzim merupakan golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai biokatalisator pada reaksi-reaksi biokimia (Lehninger, 1997). Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa seperti dapat meningkatkan produk beribu kali lebih tinggi, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, dan bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu (Boyer, 1971). Enzim termasuk metabolit primer. Metabolit primer adalah produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba. Metabolit primer dibutuhkan untuk pertumbuhan setiap mikroba (Sunarminingsih, 2002).

Salah satu enzim yang berperan di dalam industri adalah enzim protease karena enzim ini banyak digunakan untuk pangan dan nonpangan (Whittaker, 1994). Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida kecil dan asam amino (Bains, 1998; Ward, 1983; Suhartono, 1989). Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai 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).

Menurut Suhartono (1989) protein terdiri atas molekul asam amino yang bervariasi jumlahnya, 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 ditunjukkan bagi polimer asam amino dengan jumlah di atas 100.

Protease memegang peran utama di dalam banyak fungsi hayati, mulai dari tingkat sel, organ sampai organisme, yaitu dalam melangsungkan reaksi metabolisme, fungsi regulasi dan reaksi-reaksi yang menghasilkan sistem berantai untuk menjaga normal homeostatis maupun kondisi patofisiologis abnormal serta proses kematian sel terencana (Rao *et al.*, 1998).

Berdasarkan cara kerjanya Palmerr (1981) membagi protease 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.

Berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida protease dibedakan menjadi endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase menguraikan protein ujung rantai sehingga dihasilkan suatu asam amino dan sisa peptida. Protease mikroba dapat diklasifikasikan sebagai protease serin, protease sulfhydryl, protease asam dan metaloprotease (Rao, *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 2009).

2.2 Aplikasi Enzim Protease

Protease merupakan enzim penting yang 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 detergen maupun pada pemrosesan kulit (Saefudin, 2006).

Protease adalah salah satu enzim yang memiliki prospek paling baik untuk dikembangkan karena dipandang cukup luas aplikasinya dalam berbagai industri, baik pangan maupun non pangan. (Rao *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2005). Menurut Hudgson (1994), protease menduduki peringkat pertama sebagai enzim yang dipergunakan dalam industri. Industri menyerap sekitar 30-35% dari total enzim yang ada.

Industri pengguna protease diantaranya di bidang pangan sebagai pengempuk daging, penjernih bir, pembuatan keju dan pembuatan *cracker* dan dibidang non pangan (industri deterjen, industri kulit, industri tekstil) (Gupta *et al.*, 2002).

1. Industri detergen

Enzim yang diaplikasikan pada detergen harus memiliki karakteristik yang mendukung seperti pH basa, stabilitas suhu yang baik, ketahanan terhadap senyawa pengoksidasi dan memiliki spesitas yang kuat dalam industri ini protease digunakan untuk membersihkan kotoran / noda-noda. Enzim ini akan mendegradasi kotoran yang bersifat protein (Ward, 1983).

Penggunaan protease dapat mengurangi konsentrasi fosfat dalam deterjen dan menurunkan suhu air untuk mencuci pakaian, sehingga dapat menghemat energi dan mengurangi pencemaran lingkungan (Suhartono, 1989).

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 penghilangan 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). Pada pembuatan adonan yang mengandung protein tinggi seperti pada pizza, kue-kue tertentu dan beberapa jenis biskuit protease akan memperbaiki elastisitas adonan sehingga mudah ditiskan pada saat pencetakan dan meniadakan gelembung udara selama pembakaran (Cheetam, 1985).

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 methei* (Suhartono, 1989).

5. Industri bir

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

6. Industri daging

Penggunaan enzim protease pada industri daging bertujuan untuk melunakkan daging. Cara kerja enzim ini yaitu dengan menghidrolisis serabut otot, elastis dan kolagen (Winarno, 1983).

2.3 *Penicillium* sp.

Klasifikasi jamur *Penicillium* sp. menurut Alexopoulos (1979) adalah sebagai berikut ini :

Kingdom : Fungi

Divisi : Ascomycota

Class : Euecomycetes

Ordo : Eurotiales

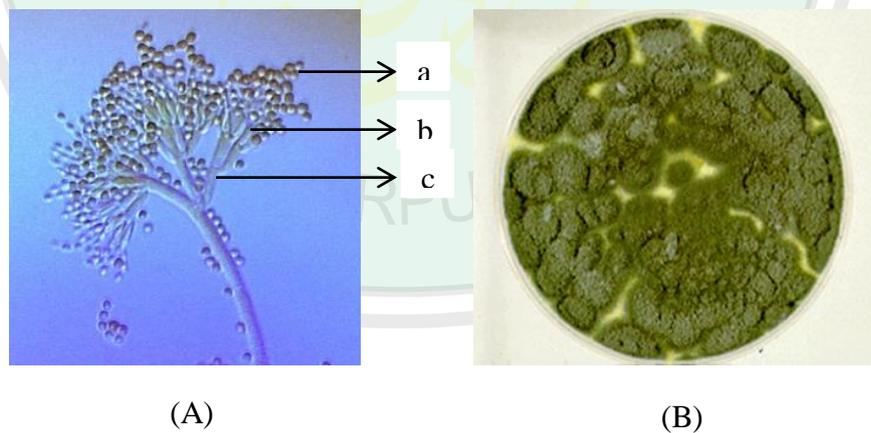
Famili : Trichocomaceae

Genus : *Penicillium*

Spesies : *Penicillium* sp.

Penicillium merupakan anggota kelas Deuteromycetes. *Penicillium* memiliki ujung konidiofor yang tidak melebar, melainkan bercabang-cabang dengan deretan konidium. Kelompok ini meliputi genus yang membentuk konidium dengan struktur yang disebut penisilus (Rahayu, dkk, 1989). *Penicillium* merupakan jamur yang sangat penting di dalam industri fermentasi untuk menghasilkan penisilin (Volk, 2003).

Ciri-ciri spesifik *Penicillium* adalah hifa bersekat atau berseptata, miselium bercabang, biasanya tidak berwarna, konidiofora bersekat dan muncul di atas permukaan, berasal dari hifa di bawah permukaan, bercabang atau tidak bercabang, kepala yang membawa spora berbentuk seperti sapu dengan sterigmata muncul di dalam kelompok, konidium membentuk rantai karena muncul satu per satu dari sterigmata. Konidium pada waktu masih muda berwarna hijau, kemudian berubah menjadi kebiruan atau kecoklatan (Fardiaz, 1992).



Gambar 1: *Penicillium* sp. (A) Kapang *Penicillium* sp. perbesaran 40x (Mark, 2008). (B) Kultur Kapang *Penicillium* sp. (Ellis, 2014).
Keterangan : a. Konidia; b. Sterigma; c. Konidiofora

Berdasarkan penelitian Yusriah dan Nengah (2013) *Penicillium* sp. merupakan jenis kapang yang menghasilkan aktivitas protease sebesar 2,416 U/ml dan dicapai pada pH 8 dan suhu 40°C. Sedangkan penelitian Haq *et al.*, (2006) menjelaskan bahwa pada suhu 25°C produksi enzim protease oleh *Penicillium chrysogenum* adalah 7,4 U/ml dan produksi enzim mengalami kenaikan pada suhu 30°C diperoleh nilai sebesar 12,79 U/ml. Produksi protease tertinggi yaitu pada tmeperatur 27°C sebesar 1,1134 dan 30°C sebesar 1,1304 yang dilihat pada spektrofotometer OD 275 nm (Gupta, 2009).

2.4 *Trichoderma* sp.

Trichoderma sp. memiliki konidiofor bercabang-cabang teratur, tidak membentuk berkas, konidium jorong, bersel satu, dalam kelompok-kelompok kecil, kelompok konidium berwarna hijau biru (Semangun, 1996). *Trichoderma* sp. juga berbentuk oval, dan memiliki sterigma atau phialid tunggal dan berkelompok (Barnett, 1960). Klasifikasi jamur *Trichoderma* spp. menurut Alexopoulos (1979) adalah sebagai berikut ini :

Kingdom : Fungi

Divisi : Amastigomycota

Subdivisi : Deuteromycotina

Class : Deuteromycetes

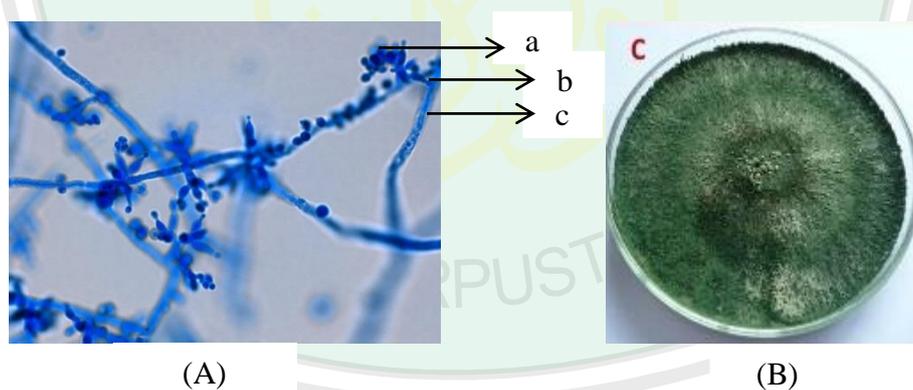
Ordo : Moniliales

Famili : Moniliaceae

Genus : *Trichoderma*

Spesies : *Trichoderma* sp.

Koloni *Trichoderma* sp. pada media agar pada awalnya terlihat berwarna putih selanjutnya miselium akan berubah menjadi kehijau-hijauan lalu terlihat sebagian besar berwarna hijau ada ditengah koloni dikelilingi miselium yang masih berwarna putih dan pada akhirnya seluruh medium akan berwarna hijau (Nurhayati, 2001). Konidifor dapat bercabang menyerupai piramida, yaitu pada bagian bawah cabang lateral yang berulang-ulang, sedangkan kearah ujung percabangan menjadi bertambah pendek. Fialid tampak langsing dan panjang terutama apeks dari cabang, dan berukuran $(2,8-3,2) \mu\text{m} \times (2,5-2,8) \mu\text{m}$, dan ber dinding halus. Klamidospora umumnya ditemukan dalam miselia dari koloni yang sudah tua, terletak interkalar kadang terminal, umumnya bulat, berwarna hialin, dan ber dinding halus (Gandjar dan Rohman, 1999).



Gambar 2. Kapang *Trichoderma* sp. (A) *Trichoderma* sp. perbesaran 1000x (B) Kultur *Trichoderma* sp. (Neethu *et al.*, 2012).

Keterangan: a. Konidia b. Sterigma c. Koniodofora

Penelitian Haggag *et al.* (2006) menyatakan bahwa aktivitas protease yang dihasilkan *Trichoderma harzianum* adalah sebesar 18 U/mg pada suhu 30°C dan produksi menurun pada suhu 40°C. Shakeri dan Howard (2006) menambahkan bahwa aktivitas protease *Trichoderma harzianum* strain 101645 sebesar 8.4 U/ml

dan strain 206040 sebesar 11.3 U/ml dengan menggunakan media CD (*Czapek Dok*) yang ditambahkan dengan kasein. *Czapek* adalah media untuk enzim protease, komposisi media *Czapek* adalah sakarosa, 2 gr NaNO₃, 1 gr KH₂PO₄, 0,5 gr MgSO₄ FeSO₄.7H₂O, 30 gr kasein, 0,5 gr KCL (Zanphorline *et al.*, 2011).

2.5 Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Menurut Noviyanti dkk. (2012) kemampuan protease dalam mempercepat reaksi dipengaruhi beberapa faktor yang menyebabkan enzim dapat bekerja dengan optimal dan efisien. Faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, senyawa inhibitor dan aktivator, pH serta temperatur lingkungan.

Semua enzim adalah protein dan aktivitas katalitiknya bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein (Sadikin, 2002). 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).

1. Suhu

Temperatur mempengaruhi aktivitas enzim. Pada temperatur rendah, reaksi enzimatik berlangsung lambat, kenaikan temperatur akan mempercepat reaksi, hingga suhu optimum tercapai dan reaksi enzimatik mencapai maksimum. Kenaikan temperatur melewati temperatur optimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi dan menurunkan kecepatan reaksi enzimatik (Wuryanti, 2004).

Suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalis suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Sejalan dengan meningkatnya suhu, semakin 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 (Pertiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1997). Produksi protease optimal dari *Penicillium* sp. dihasilkan pada suhu 40°C (Yusriyah dan Nengah, 2013).

2. pH

Menurut Lehninger (1998) pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling efektif dalam mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim akan hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional. Palmer (1981) menambahkan aktivitas enzim yang menurun karena

perubahan pH disebabkan oleh berubahnya keadaan ion substrat dan enzim. Perubahan tersebut dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kuartener enzim aktif.

Pada skala deviasi pH yang besar, perubahan pH akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi karena adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3 dimensi enzim (Baehaki, 2005).

Berdasarkan pH optimumnya, protease di klasifikasikan pada protease asam, netral dan alkalin. Rentang pH 8–12 dapat diklasifikasikan sebagai protease alkalin (North, 1982). Protease dengan aktivitas dan stabilitas tinggi pada kisaran protease alkalin dan suhu tinggi sangat baik digunakan pada aplikasi bioengineering dan bioteknologi (Hajji, 2007).

Produksi protease optimal dari *Penicillium* sp. dihasilkan pada pH 8. Hal ini menunjukkan hawa protease dari *Penicillium* sp. termasuk dalam protease alkali (Yusriyah dan Nengah, 2013).

3. Konsentrasi Enzim

Seperti pada katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994).

4. Ada tidaknya aktivator dan inhibitor

Kerja enzim dapat terhalang oleh zat lain. Zat yang dapat menghambat kerja enzim disebut inhibitor. Zat penghambat atau inhibitor dapat menghambat kerja enzim untuk sementara atau secara tetap. Inhibitor enzim dibagi menjadi dua, yaitu inhibitor kompetitif dan inhibitor nonkompetitif.

a. Inhibitor kompetitif

Inhibitor kompetitif adalah molekul penghambat yang bersaing dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif enzim. Contohnya, sianida bersaing dengan oksigen untuk mendapatkan hemoglobin dalam rantai respirasi terakhir. Penghambatan inhibitor kompetitif bersifat sementara dan dapat diatasi dengan cara menambah konsentrasi substrat.

b. Inhibitor nonkompetitif

Inhibitor nonkompetitif adalah molekul penghambat enzim yang bekerja dengan cara melekatkan diri pada luar sisi aktif enzim. Sehingga, bentuk enzim berubah dan sisi aktif enzim tidak dapat berfungsi. Hal ini menyebabkan substrat tidak dapat masuk ke sisi aktif enzim. Penghambatan inhibitor nonkompetitif bersifat tetap dan tidak dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat.

Selain inhibitor, terdapat juga aktivator yang mempengaruhi kerja enzim. Aktivator merupakan molekul yang mempermudah enzim berikatan dengan substratnya.

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

5. Aktivitas enzim dipengaruhi pula oleh konsentrasi substrat

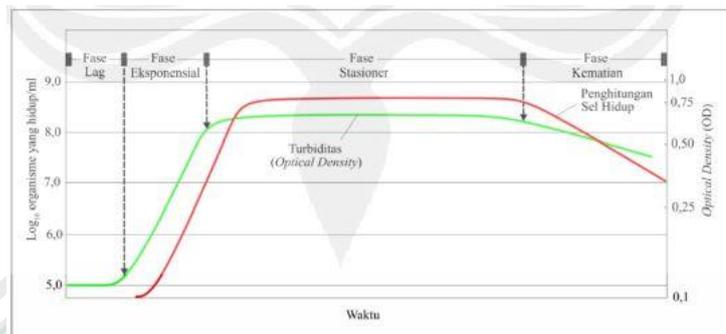
Menurut Pratiwi (2008) menjelaskan bahwa pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat banyaknya substrat terikat dengan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

2.6 Kurva Pertumbuhan Kapang

Definisi pertumbuhan pada organisme multiseluler (termasuk kapang) adalah peningkatan jumlah sel per organisme, sehingga ukuran sel juga menjadi lebih besar. Pertumbuhan mikroorganisme dapat digambarkan sebagai kurva pertumbuhan yang menjelaskan siklus pertumbuhan suatu mikroorganisme seutuhnya, yang umumnya terbagi menjadi 4 fase, yaitu (Madigan dan Martinko, 2006):

1. Fase lag, merupakan fase awal yang muncul ketika mikroorganisme menyesuaikan diri dengan lingkungan baru (medium baru). Fase tersebut dapat muncul karena perbedaan nutrisi medium pada kultur awal dan baru atau bisa juga karena umur inokulum yang sudah cukup tua.
2. Fase eksponensial, merupakan suatu fase ketika sel mulai aktif membelah diri dengan waktu generasi yang panjang. Fase tersebut akan berhenti sesuai dengan ketersediaan nutrisi di dalam medium dan beberapa faktor lain. Menurut Widjaja, *et.al.* (2009) kapang mengalami fase eksponensial ketika spora yang tumbuh memenuhi media. Safiana (2013) menambahkan bahwa kapang *Trichoderma* berada pada fase eksponensial ketika berumur 6 hari. Sedangkan kapang *Penicillium* berada pada fase eksponensial ketika berumur 7 hari (Alfiah dan Kuswytasari, 2012).
3. Fase stasioner, merupakan suatu fase ketika jumlah sel mikroorganisme di dalam kultur tidak mengalami pertambahan maupun pengurangan, sehingga membentuk keseimbangan. Fase tersebut muncul karena dua faktor umum, yaitu karena nutrisi penting di dalam medium sebagian besar telah habis digunakan dan karena adanya beberapa produk buangan dari metabolisme sel yang terakumulasi di dalam medium dan menghambat pertumbuhan.
4. Fase kematian, merupakan suatu fase ketika sebagian besar sel di dalam kultur mengalami kematian dan lisis sel karena kehabisan nutrisi. Jumlah sel-sel yang mati lebih banyak dari pada sel-sel yang masih hidup.

Kurva pertumbuhan mikroorganisme yang terdiri dari beberapa fase pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar :



Gambar 3: Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme
(Sumber: Madigan dan Martinko, 2006)

Menurut Aunstrup (1979) menyatakan bahwa 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, nutrisi dan kondisi aerob.

Seperti dalam al Qur'an surat Huud 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 melatapun di bumi melainkan Allah-lah yang memberi rizkinya dan Dia mengetahui tempat berdiam binatang itu dan tempat penyimpanannya, semua tertulis dalam kitab yang nyata (Lauh mahfuzh)” (QS. Al-Huud: 6).

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah tidak hanya menciptakan makhluk hidup melainkan Allah juga memberi rizki dengan menciptakan segala sesuatu

yang dibutuhkan makhluk hidup seperti oksigen, udara, air, cahaya, dan makanan. Makanan atau nutrisi merupakan salah satu faktor yang dibutuhkan untuk pertumbuhan kapang, dengan nutrisi yang cukup dan komposisi medium yang sesuai kapang akan dapat tumbuh dengan baik sehingga dapat menghasilkan enzim protease yang maksimal.

2.7 Limbah Cair Tahu

Pemilihan sumber makanan untuk memproduksi enzim bergantung dari jenis mikroorganisme dan jenis enzim yang diproduksi dan ketersediannya di alam. Pemanfaatan limbah yang tersedia di alam atau substrat yang bernilai ekonomis rendah dapat digunakan sebagai media tumbuh. Proses fermentasi merupakan proses perubahan substrat menjadi produk dengan bantuan enzim. Dalam proses ini perlu diperhatikan komposisi media agar proses berlangsung baik. Teknologi fermentasi telah banyak memanfaatkan limbah untuk menghasilkan berbagai produk. Limbah yang digunakan sebagai media pertumbuhan diharapkan mempunyai kadar nutrisi yang tinggi, mudah didapat dan harganya relatif murah (Suhartono, 1996).

Limbah tahu adalah limbah yang dihasilkan dalam proses pembuatan tahu maupun pada saat pencucian kedelai. Limbah yang dihasilkan berupa limbah padat dan cair (Agung dan Hendri, 2010). 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 berlimpah. 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).

Limbah cair industri tahu memiliki beban pencemar yang tinggi. Pencemaran limbah cair industri tahu berasal dari bekas pencucian kedelai, perendaman kedelai, air bekas pembuatan tahu dan air bekas perendaman tahu. Air limbah tersebut mengandung bahan organik, bila langsung dibuang ke badan air penerima tanpa adanya proses pengolahan maka akan menimbulkan pencemaran, seperti menimbulkan rasa dan bau yang tidak sedap dan berkurangnya oksigen yang terlarut dalam air sehingga mengakibatkan organisme yang hidup didalam air terganggu karena kehidupannya tergantung pada lingkungan sekitarnya. Pencemaran yang dilakukan terus menerus akan mengakibatkan matinya organisme yang ada dalam air, air berubah kondisinya menjadi anaerob (Agung dan Hendri, 2010). Menurut Mufarrihah (2009) limbah cair tahu mengandung bahan organik dan nutrien 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.

2.8 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). Menurut Schalbroek (2001) menyatakan bahwa 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 digunakan sebagai bahan pakan ternak.

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%. Penambahan dedak dalam substrat akan dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangan, sehingga menyebabkan mikroba cepat tumbuh dan mudah berkembang biak.

Fungsi dari penambahan dedak adalah untuk meningkatkan nutrisi media tanam sebagai sumber karbohidrat, karbon (C) dan nitrogen (N). Dedak sebagai sumber N dan thiamin (Vitamin B₁) berfungsi dalam pembentukan dan pengembangan. Silverio (1981) menerangkan bahwa adanya penambahan nitrogen yang menyebabkan pertumbuhan miselium.

2.9 Pengujian Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas protease ini menggunakan metode Bregmeyer dan Gassal (1983). Prinsip kerja dari metode ini yaitu kasein yang berfungsi sebagai substrat akan dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino.

Seperti dalam Al-Qura'an surat Adz-Dzariyaat ayat 49 bahwa Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini berpasangan.

وَمِنْ كُلِّ شَيْءٍ خَلَقْنَا زَوْجَيْنِ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ ﴿٤٩﴾

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

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu disertai dengan pasangannya. Seperti halnya Allah menciptakan laki-laki dan perempuan, siang dan malam. Begitu juga enzim diciptakan berpasangan dengan substratnya. Enzim memiliki spesifitas atau kekhasan terhadap substrat (Pelczar dan Chan, 1988).

Enzim protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks dan hanya dapat mengkatalisis zat yang mengandung protein misalnya kasein dan albumin (Ward, 1983).

Laju pembentukan peptida dan asam amino tersebut dapat dijadikan tolok ukur aktivitas katalis protease. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease, dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan TCA (*Trichloro Acetic Acid*). Asam amino dan peptida akan dilarutkan dengan TCA, sedangkan protein yang memiliki bobot molekul yang besar akan mengendap. TCA juga berfungsi menginaktifkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis dibantu oleh sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk melalui tahap pemisahan tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm (Yusriyah dan Nengah, 2013).

Pengukuran aktivitas enzim protease diperlukan dengan membuat larutan standar tirosin yang digunakan untuk pembuatan persamaan linier yang nantinya

akan diinterpolasikan dengan nilai absorbansi yang diperoleh. Tirosin merupakan asam amino aromatik yang dapat menyerap panjang gelombang 275 nm (Sulastri, 2008). Sebagai larutan standar dalam uji aktivitas protease untuk mengukur aktivitas protease dalam memecah protein menjadi asam amino (Yusriah dan Nengah, 2013).

