

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN LAMA WAKTU
INKUBASI TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE
YANG DIPRODUKSI OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

Oleh:

Eva Zunia Prastika

NIM. 14620020



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN LAMA WAKTU
INKUBASI TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE
YANG DIPRODUKSI OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

Oleh :
EVA ZUNIA PRASTIKA
NIM. 14620020

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)

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2018**

HALAMAN PERSETUJUAN

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN LAMA WAKTU
INKUBASI TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE
YANG DIPRODUKSI OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

Oleh:
Eva Zunia Prastika
NIM. 14620020

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
tanggal: 2 Oktober 2018

Dosen Pembimbing I



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

Dosen Pembimbing II



Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIDT.1986 0512206 08011060

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi**



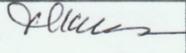
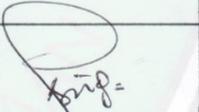
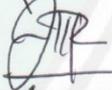
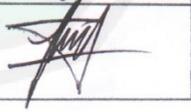
Romaidi, M.Si. D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

**PENGARUH KONSENTRASI SUBSTRAT DAN LAMA WAKTU
INKUBASI TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE
YANG DIPRODUKSI OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

**Oleh:
Eva Zunia Prastika
NIM. 14620020**

telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal 2 Oktober 2018

Penguji Utama	<u>Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd</u> NIP.19630114 199903 1 001	
Ketua Penguji	<u>Prilya Dewi Fitriasari M.Sc</u> NIDT. 19900428201608012062	
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 0801 1060	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi




Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP.19810201 20090 1 019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Eva Zunia Prastika

NIM : 14620020

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Pengaruh Konsentrasi Substrat Dan Lama Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Protease Yang Diproduksi Oleh *Bacillus Subtilis*

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

Malang, 2 Oktober 2018

Yang membuat pernyataan,



Eva Zunia Prastika
NIM. 14620020

MOTTO

”لَا يُكَلِّفُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا“

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai kesanggupannya “
(Q.S al-Baqarah ayat 286)

“Pahlawan bukanlah orang yang berani meletakkan pedangnya ke pundak lawan, tetapi pahlawan sebenarnya ialah orang yang sanggup menguasai dirinya dikala ia marah”
(Sydney Harris)

LEMBAR PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim...

Karya sederhana ini saya persembahkan kepada :

Allah Subhanahu wata'ala dan Rasulullah Salallahu'alaihi wasallam

Kedua orangtua Bapak Kamad dan Ibu Siti Imroatin serta adik saya Maulidyah Putri Dwi Hertanti yang sangat saya sayangi, yang telah mencurahkan kasih sayang, doa, kesabaran, dan keikhlasan dalam mendidik dan memotivasi saya dalam menyelesaikan penulisan ini.

Teman rasa sahabat rasa saudara Afni, Lisnai, Kiki (Paha ayam), limjuk (Liena) dan seseorang yang baik yang selalu membantu saya mulai awal masuk Uin Malang sampai sekarang yaitu Ryand, terimakasih atas dukungan, doa, kesabaran, bantuannya dan nasehatnya yang luar biasa.

Tim sukses yang selalu membantu saya dan menemani saya ke kampus tetangga (Lina, Ulin, Uul, Ana, Miftah, Nada) dan tim hore yang selalu menyemangati saya (Dika, Dyta, Yoda dan arina) terimakasih atas bantuan kalian dan semangat yang luar biasa dari kalian.

Keluarga besar biologi 2014, khususnya Biologi A terimakasih telah menjadi teman, sahabat, keluarga yang telah mendukung dan menjadi tempat berbagi suka maupun duka.

Dan untuk semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur Alhamdulillah kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq, hidayah, dan kasih sayang-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Lama Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Protease Yang Diproduksi Oleh *Bacillus subtilis*”. 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 Mujahidin Ahmad, M.Sc, selaku dosen wali dan 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. Dr.H. Eko Budi Minarno, M.Pd, dan Prilya Dewi Fitriasari M.Sc 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. Seluruh Dosen, Laboran Jurusan Biologi, dan Staf Administrasi yang telah banyak membantu dan memberikan ilmu yang bermanfaat.
7. Malaikat hatiku Bapak kamad, Ibu Siti Imroatin, serta Adik Maulidyah Putri Dwi Hertanti yang selalu ada dan selalu memberikan doa, serta dukungan yang sangat luar biasa.
8. Teman-teman seperjuangan Biologi 2014 yang selalu memberikan semangat dan dukungan.
9. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril. Penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. Amin yarobbal Alamin.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Malang, 02 Oktober 2018

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	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
الملخص.....	xiii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan.....	6
1.4 Hipotesis.....	7
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
1.6 Batasan masalah	8
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.2 Enzim Protease	11

2.3 Aplikasi Enzim Protease	17
2.4 Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim	20
2.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri	24
2.6 Pengujian Aktivitas Protease	28
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Rancangan penelitian	32
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian	33
3.3. Variabel Penelitian	33
3.3.1 Variabel Bebas	33
3.3.2 Variabel Terikat	34
3.4. Alat dan Bahan	34
3.4.1 Alat	34
3.4.2 bahan	34
3.5. Prosedur penelitian	34
3.5.1 Pembuatan media	34
3.5.1.1 Pembuatan media Agar Nutrien (NA)	34
3.5.1.2 Media produksi Protease	35
3.5.2 Peremajaan Isolat <i>Bacillus subtilis</i>	35
3.5.3 Kurva pertumbuhan Bakteri	35
3.5.4 Uji kualitatif protease	36
3.5.5 Uji Kuantitatif Protease	36
3.5.2.1 Produksi Enzim protease	36
3.5.2.2 Pengukuran Pengaruh Konsentrasi substrat dan Pengaruh lama waktu inkubasi	37
2.6 analisis Data	39
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.5 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Protease yang Dihasilkan oleh <i>Bacillus subtilis</i>	40
4.6 Pola Pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i>	42
4.3 Pengaruh Interaksi Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi terhadap aktivitas enzim protease	45

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan..... 56

5.2 Saran..... 57

DAFTAR PUSTAKA.....58



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Konsentrasi Substrat dan Lama Waktu Inkubasi	33
Tabel 4.1 Uji DMRT Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Lama Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Protease	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	10
Gambar 2.2 Mekanisme Umum Hidrolisis Enzimatis Substrat Peptida.....	13
Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	24
Gambar 2.4 Struktur Kasein.....	29
Gambar 4.1 Petri dengan Media SMA menunjukkan zona bening yang dihasilkan dari aktivitas enzim protease <i>Bacillus subtilis</i>	41
Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	43
Gambar 4.3 Grafik Pengaruh Interaksi Konsentrasi substrat dan Lama Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Protease dari <i>Bacillus subtilis</i>	49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Pereaksi Aktivitas Enzim Protease Metode Bergmeyer (1983)	65
Lampiran 2. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Protease	70
Lampiran 3. Analisis Data.....	72
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian	74



ABSTRAK

Prastika, Eva Zunia. 2018. **Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Lama Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Protease yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis***. 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 : Konsentrasi Substrat, Lama Waktu Inkubasi, Enzim Protease, *Bacillus subtilis*

Protease merupakan salah satu enzim yang paling dibutuhkan dalam bidang industri enzim. Protease adalah enzim yang dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme yang mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino dan peptida sederhana. Protease dapat diisolasi dari berbagai macam sumber seperti tanaman, hewan dan mikroba. *Bacillus subtilis* merupakan salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim protease yang dapat menghidrolisis protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*.

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor yang masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Faktor yang pertama adalah variasi konsentrasi substrat 0,5%, 1%, 1,5% dan 2% sedangkan faktor kedua adalah variasi lama waktu inkubasi 30 menit, 40 menit dan 50 menit. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *analysis Of Variance* (ANOVA) dan jika terdapat pengaruh nyata terhadap parameter maka dilakukan uji lanjut dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kesalahan 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi substrat dan lama inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis*. Aktivitas protease tertinggi diperoleh pada interaksi konsentrasi substrat 1,5 % dan lama waktu inkubasi selama 40 menit sebesar 10,998 U/ml, sedangkan aktivitas protease terendah diperoleh pada perlakuan interaksi konsentrasi substrat 0,5% dan lama waktu inkubasi selama 30 menit sebesar 0,759 U/ml.

ABSTRACT

Prastika, Eva Zunia. 2018. **The Effect Of Concentration Substrate and Incubation period on the Activity Protease Enzyme Produce by *Bacillus subtilis*.** Biology Department of Science Faculty State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor: (I) Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si. (II) Mujahidin Ahmad, M.Sc

Keywords: *Concentration Substrate, Incubation period, Protease Enzyme, Bacillus subtilis*

Protease is one of the most needed enzymes in the enzyme industry. Protease is an enzyme produced extracellularly by microorganisms that can hydrolyze proteins into simple amino acids and peptides. Protease can be isolated from various sources such as plants, animals and microbes. *Bacillus subtilis* is one of the bacteria that can produce protease enzymes that can hydrolyze proteins. This study was to determine the effect of substrate concentration substrat and incubation period on the Activity Protease Enzyme Produce by *Bacillus subtilis*.

This research is experimental using a Completely Randomized Design (CRD) factorial design with two factors treatments and 3 times repetition. The first factor with variation of substrate concentration which consists of 4 levels those are, 0.5%, 1%, 1.5% and 2%. The second factor with variation of incubation period which consists of 3 levels those are 30 minutes, 40 minutes and 50 minutes. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and if significant effected the parameters, than it would be continued by Duncan Multiple Range Test (DMRT) at a 5% error level.

The results showed that the combination of substrate concentration and incubation period affected the protease enzyme activity thus produced by *Bacillus subtilis*. The highest protease enzyme activity obtained from 1.5% substat consentratian with 40 minutes incubation period and value of protease enzyme activity 10.998 U / ml. While the lowest protease enzyme activity obtained from 0.5% substrate concentration treatment with 30 minutes incubation period and value of protease enzyme activity 0,759 U/ml.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang mempunyai berbagai macam keanekaragaman, antara lain terdapat hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Keanekaragaman tersebut mampu memberikan peluang yang cukup besar bagi manusia. Salah satu manfaat yang terdapat dari keanekaragaman tersebut ialah mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan oleh manusia yaitu bakteri *Bacillus subtilis* yang dapat dikembangkan sebagai penghasil enzim. Salah satu enzim yang dapat dihasilkan yaitu enzim protease (Akhdiya, 2003) keberadaan mikroorganisme secara implisit dapat dikaitkan Al-Qur'an surat Yunus (10) ayat 61 yang berbunyi :

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُو 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 : “ kami tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al-Qur'an dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan , melainkan kami menjadi saksi atasmu diwaktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarra (atom) di bumi ataupun dilangit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfudzh).

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.

Kata *dzarrah* (atom) dalam ayat diatas memiliki arti bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT dengan ukuran yang sangat kecil yang terdapat di bumi dan dilangit yang bisa dikaji dalam ilmu biologi yang sering disebut

sebagai mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan untuk menghasilkan enzim yaitu dari spesies *Bacillus subtilis*.

Sebagian besar dari genus *Bacillus* sp merupakan suatu produsen utama yang mampu menghasilkan enzim protease secara ekstraseluler (Nascimento dan Martins, 2006). Mikroorganisme jenis *Bacillus* mampu tumbuh dalam substrat yang murah serta mampu hidup dalam temperatur tinggi, tidak mengandung toksik dan tidak ada hasil samping metabolik (Doi, 1992). Salah satu jenis *Bacillus* sp yang sering digunakan dalam industri pangan maupun non pangan yaitu spesies *Bacillus subtilis* (Soeka dan Sulistiani, 2014). Bakteri endofit *Bacillus* memiliki potensi dalam menghasilkan enzim protease, amylase dan lipase (Fatichah, 2011).

Enzim merupakan senyawa organik yang tersusun atas protein yang dapat berfungsi sebagai katalis yang berada didalam tubuh makhluk hidup, dan enzim juga mempunyai peran penting yaitu sebagai biokatalisator yang terdapat dalam reaksi biokimia (Lehninger, 1997). Keunggulan enzim sebagai katalisator yaitu memiliki spesifitas tinggi dan dapat mempercepat reaksi kimia tanpa membentuk produk samping (Chaplin, 1990). Protease juga termasuk kedalam salah satu kelompok besar enzim, dan merupakan suatu enzim yang sering digunakan dalam bidang bioteknologi, hal ini dikarenakan protease sangat selektif dalam menghidrolisis ikatan peptida yang berada didalam substansi yang mengandung protein menjadi oligopeptida dan asam-asam amino (Guangrong, *et al.* 2006).

Protease adalah enzim yang memiliki prospek yang baik untuk dikembangkan, dikarenakan memiliki cakupan yang luas untuk diaplikasikan dalam berbagai bidang industri dan telah diperjual belikan diseluruh dunia (Bholay, 2012). Protease mampu mengkatalis pemutusan ikatan peptida pada protein dikarenakan enzim protease termasuk enzim proteolitik (Smith, 1990). Enzim dapat dihasilkan secara intraseluler dan ekstraseluler oleh suatu mikroorganisme yang mempunyai peran penting dalam metabolisme dalam sel (Ward, 1983).

Protease memiliki potensi yang dapat diaplikasikan dalam bidang industri pangan, antara lain dapat meningkatkan nilai gizi, pengolahan susu menjadi keju, pelunak daging, penjernihan bir, dan industri farmasi yang dapat digunakan untuk mengurangi senyawa organik, sedangkan protease yang digunakan untuk industri non pangan yaitu digunakan untuk industri deterjen, cairan pembersih lensa pada kaca mata, serta dapat digunakan dalam mengelola limbah industri (Gupta *et al*, 2002).

Enzim protease dapat dihasilkan oleh hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Penggunaan hewan dan tumbuhan masih dibatasi dikarenakan menggunakan tumbuhan dan hewan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mendapatkan enzim yang sesuai, sedangkan mikroorganisme mampu tumbuh dalam waktu yang relatif cepat serta mampu menghasilkan enzim yang lebih potensial dibandingkan tanaman dan hewan (Rao *dkk.* 1998). Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dengan waktu yang singkat, untuk menghasilkan enzim yang berasal dari mikroorganisme dapat dilakukan pengaturan kondisi

pertumbuhan untuk menghasilkan enzim yang akan diproduksi supaya lebih optimal.

Bacillus subtilis yang diisolasi dari daun kenikir (*Cosmos sulphureus*) mampu menghasilkan enzim protease. Wibawani (2016) telah berhasil mengisolasi bakteri endofit yang berupa *Bacillus subtilis* dari daun kenikir. Genus *Bacillus* pada umumnya mampu hidup disumber air panas sehingga termasuk bakteri termofilik, sehubungan dengan penelitian Wibawani (2016) ini, maka *Bacillus subtilis* tidak harus diperoleh dari habitat sumber air panas, namun dapat diperoleh dari tanaman antara lain daun kenikir (*Cosmos sulphureus*). *Bacillus subtilis* diketahui memiliki potensi untuk menghasilkan enzim protease sebagai mana dikemukakan oleh Faizah (2017) yang menyatakan bahwa *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) dan ditumbuhkan pada media campuran limbah cair tahu dapat bekerja secara optimum pada pH 8 dan suhu 55⁰C menghasilkan aktivitas sebesar 1,511 U/ml.

Terdapat beberapa faktor yang mampu mempengaruhi aktivitas enzim antara lain pH, suhu, konsentrasi dan jenis substrat yang digunakan, lama waktu inkubasi serta terdapat aktivator dan inhibitor (Hames dan Hooper, 2005). Suhu dan pH merupakan salah satu faktor yang harus diketahui terlebih dahulu (Sari, 2008), hal ini dikarenakan setiap enzim mampu bekerja secara optimal dalam suhu dan pH yang sesuai (Fitriani,2003).

Beberapa hasil penelitian yang membahas tentang potensi *Bacillus subtilis* dalam memproduksi enzim protease pada konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi yang berbeda-beda. Kosim (2010) menjelaskan bahwa *Bacillus subtilis*

mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas tinggi pada waktu inkubasi sekitar 50 menit pada suhu 50⁰C dan dengan pH 8 sebesar 0,094 U/ml. Hasil penelitian lainnya menurut Hartanti (2012) menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp B1 menunjukkan waktu produksi untuk menghasilkan enzim yang optimal yaitu pada waktu 60 menit dengan aktivitas 0,148 U/ml . Maziah (2009) menjelaskan bahwa kondisi optimum aktivitas katalitik protease termofilik yaitu pada waktu inkubasi selama 40 menit dengan suhu 65⁰C dengan pH 9 menghasilkan aktivitas enzim sebesar 5,25 U/ml.

Selain faktor lama waktu inkubasi, konsentrasi substrat juga dapat berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Berdasarkan hasil penelitian Lestari (2013) menjelaskan bahwa dengan menggunakan substrat kasein sebesar 1% didapatkan aktivitas protease sebesar 0,738 U/ml. Penelitian lainnya menurut Zufahair (2011) dengan menggunakan substrat kasein sebanyak 2% maka dihasilkan aktivitas enzim protease sebesar 0,722. Naiola (2012) juga menjelaskan bahwa menggunakan substrat kasein 1 % menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi yaitu 1,40 U/ml. Poedjiadi dan Supriyanti (2006) mengatakan jika konsentrasi substrat yang digunakan tinggi, maka sisi aktif enzim yang berikatan dengan substrat semakin banyak, namun jika konsentrasi substrat yang digunakan terlalu tinggi maka tidak akan meningkatkan laju reaksi tetapi dapat menurunkan aktivitas enzim tersebut.

Berdasarkan latar belakang diatas dapat diduga bahwa dengan menggunakan spesies sama, diisolasi dari tempat yang berbeda dan diberi perlakuan yang berbeda, maka 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 konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas protease.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ada pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis*?
2. Apakah ada pengaruh lama waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis*?
3. Apakah ada pengaruh interaksi konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* ?

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis*.
2. Mengetahui pengaruh lama waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis*.
3. Mengetahui pengaruh interaksi konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

1. Aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* tinggi pada konsentrasi substrat optimum.
2. Aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* tinggi lama waktu inkubasi optimum.
3. Aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* tinggi pada konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi optimum.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian kali ini yaitu sebagai berikut :

1. Memberikan informasi terhadap perkembangan ilmu biologi khususnya tentang mikroba yang dapat menghasilkan suatu enzim yang dapat digunakan untuk bioteknologi misalkan untuk pemuatan keju dan pembuatan biodetergen.
2. Memberikan informasi mengenai potensi bakteri endofit *Bacillus subtilis* dalam menghasilkan enzim protease.
3. Memberikan informasi tentang konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan *Bacillus subtilis*.
4. Memberikan informasi untuk penelitian kedepannya, supaya dapat lebih mengembangkan potensi bakteri endofit *Bacillus subtilis* sebagai agen mikroorganisme penghasil enzim protease.

1.6 Batasan masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bakteri *Bacillus subtilis* diperoleh dari koleksi laboratorium mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang diisolasi dari daun kenikir (*Cosmos sulphureus*).
2. Variasi perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi substrat (0,5%, 1% , 1,5% dan 2 %) dan lama waktu inkubasi (30 menit, 40 menit dan 50 menit).
3. Suhu yang digunakan 55⁰C
4. pH yang digunakan yaitu pH 8.
5. Parameter yang dianalisis adalah aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* yang ditunjukkan dengan pengukuran nilai aktivitas enzim yang dihasilkan (U/ml).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus subtilis*

Genus *Bacillus* merupakan salah satu dari jenis bakteri yang dapat menghasilkan endospora, endospora yang berasal dari genus *Bacillus* mempunyai beberapa bentuk antara lain, ada yang berbentuk bulat, oval, elips atau silinder yang biasanya terbentuk di dalam sel vegetatif. Salah satu bentuk yang dapat membedakan bacillus dengan bakteri yang lain, yaitu dari bentuk endospora nya. Spora *Bacillus* pertama kali di deskripsikan oleh Cohn pada tahun 1872 dengan sebutan *Bacillus subtilis* yang semula disebut dengan *Vibrio subtilis* oleh Ehrenberg pada tahun 1835 (Gordon,1981).

Genus *Bacillus* dapat menghasilkan enzim dengan aktivitasnya yang tinggi kecuali dari spesies *B.sereus* dan *B. anthracis*. Mikroba jenis *Bacillus* mudah ditumbuhkan, tidak membutuhkan substrat mahal dan tidak menghasilkan toksik. Kemampuan *Bacillus* juga mampu bertahan dalam kondisi suhu yang tinggi dan mempunyai kemampuan dalam memproduksi sejumlah protein eksternal sehingga *Bacillus* banyak digunakan dalam industri (Doi, 1992).

Bacillus subtilis termasuk kedalam bakteri gram positif yang mempunyai bentuk basil dan termasuk bakteri aerob, oleh karena itu dalam proses fermentasi harus diperhatikan kadar oksigen yang dibutuhkan. *Bacillus subtilis* dapat ditemukan pada tanah, air dan sebagian juga termasuk flora normal yang berada pada usus manusia. Karakteristik lain yang dimiliki oleh genus *Bacillus* yaitu mampu bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim dan masih dapat

membentuk spora. Bakteri jenis *Bacillus* mampu tumbuh pada salinitas yang ekstrim (Cartwright, 2009).

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

Kingdom : Procaryotae

Filum : Firmicuter

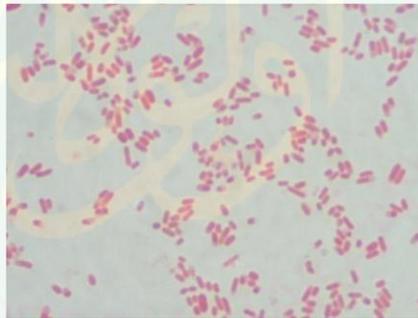
Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Familli : Bacillaceae

Genus : Bacillus

Spesies : *Bacillus subtilis*



Gambar 2.1 *Bacillus subtilis* (Kosim, 2010)

Bacillus subtilis yang digunakan berasal dari bakteri endofit yang diisolasi dari daun kenikir. Bakteri endofit termasuk bakteri yang menumpang pada jaringan tanaman tanpa menimbulkan penyakit pada tanaman yang ditumpang, sehingga tanaman yang ditumpang tidak mengalami kerugian. Diketahui bahwa keberadaan bakteri endofit didalam jaringan tanaman dapat berperan dalam memperbaiki pertumbuhan tanaman karena mampu menghasilkan hormon yang

dapat mempercepat pertumbuhan, memobilisasi fosfat dan memfiksasi nitrogen (Backman dan sikora, 2008).

Spesies dari *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus subtilis* dalam beberapa tahun terakhir ini telah banyak digunakan dalam bidang mikrobiologi industri, alasan dipilihnya dari kedua spesies tersebut yaitu dikarenakan laju pertumbuhannya yang cepat pada saat proses fermentasi, kemudian mampu mensekresikan enzim ke medium ekstraseluler dan status keamanannya yang GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (Schallmeyer *et al.*, 2004).

2.2 Enzim Protease

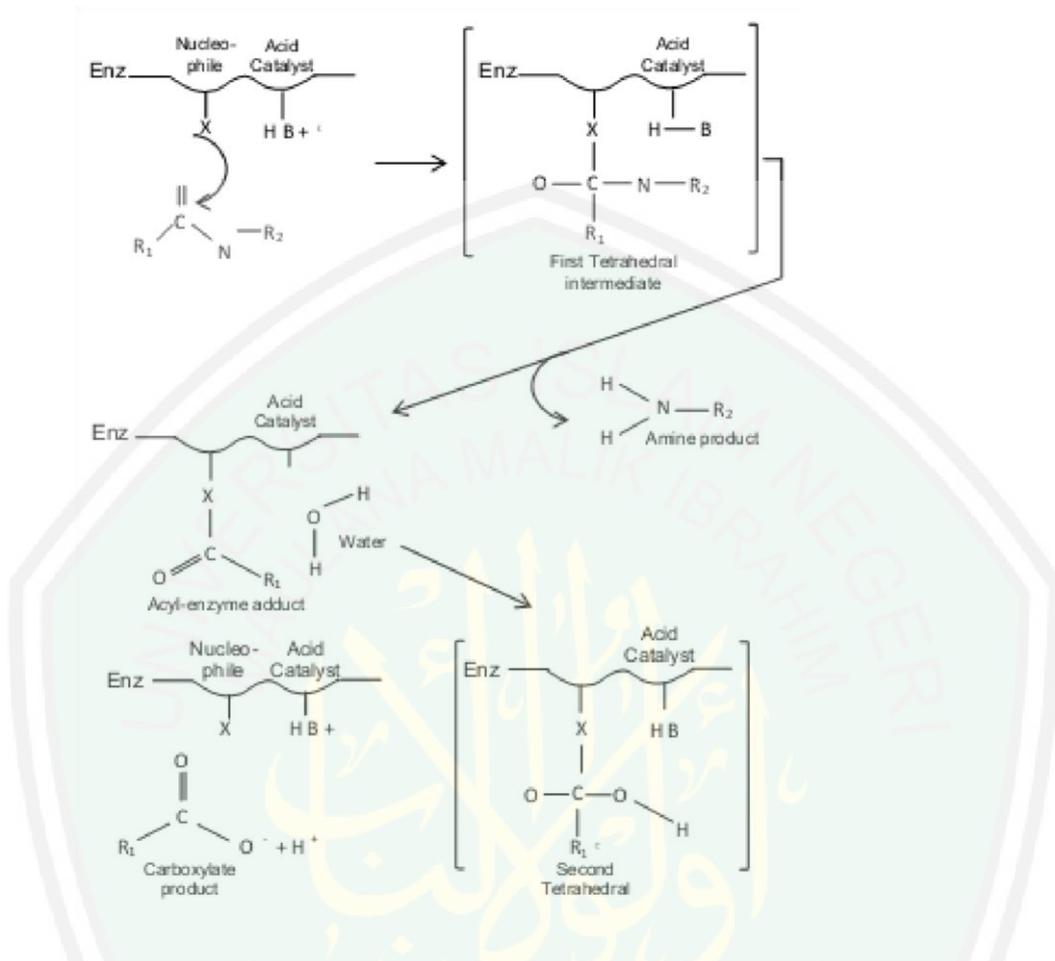
Enzim merupakan molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan mampu bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia didalam tubuh. (Suhartono, 1989). Enzim banyak digunakan dalam dunia industri karena mempunyai sifat yang potensial untuk dimanfaatkan, antara lain daya katalitiknya yang besar dan spesifitasnya terhadap substrat dari reaksi yang dikatalisisnya (Lehninger, 1997).

Enzim memiliki kelebihan yaitu sebagai katalisator, diantaranya yaitu enzim memiliki spesifitas yang tinggi, enzim hanya mengkatalis substrat tertentu, tidak terbentuknya produk sampingan, mampu mengurangi biaya dalam menghasilkan produktifitas yang baru dan produk akhir pada umumnya tidak terkontaminasi sehingga dapat mengurangi efek terhadap rusaknya lingkungan. Selama ini enzim telah banyak digunakan, antara lain pada bidang industri pangan, maupun industri non pangan. Dalam bidang pangan enzim yang sering digunakan yaitu amilase, invertase, glukosa-isomerase, papain dan bromelin,

sedangkan enzim yang sering digunakan dalam bidang kesehatan yaitu amilase, lipase dan protease (Boyer, 1971).

Enzim protease termasuk enzim yang dapat memecahkan protein menjadi ikatan yang lebih sederhana atau yang sering disebut dengan oligopeptida. Enzim protease dapat mengkatalis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Protease juga termasuk enzim proteolitik yang sangat kompleks, enzim protease dihasilkan secara ekstraseluler oleh suatu mikroorganisme dan berperan penting dalam metabolisme sel (Ward, 1983). Enzim protease dihasilkan secara ekstraseluler, sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar (Rao *et al.*, 1998).

Protease tidak hanya dihasilkan oleh bakteri tetapi hewan dan tumbuhan juga mampu menghasilkan enzim protease. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber penghasil protease masih dibatasi hal ini dikarenakan masih terbatasnya lahan tanaman dan membutuhkan waktu yang lama untuk memproduksi enzim protease. Produksi protease yang dihasilkan dari hewan juga masih dibatasi, karena ketersediaannya hewan ternak yang dapat menghasilkan enzim masih terbatas, kemudian juga membutuhkan biaya yang cukup tinggi untuk perawatan ternak tersebut. Mikroorganisme merupakan salah satu sumber enzim yang paling banyak digunakan, hal ini dikarenakan enzim yang berasal dari bakteri lebih menguntungkan, mikroorganisme dapat tumbuh dalam waktu 24 jam, kemudian mampu tumbuh pada substrat yang murah, mudah ditingkatkan hasilnya dengan pengaturan kondisi pertumbuhan dan mudah untuk direkayasa genetiknya (Rao, 1998).



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

Hidrolisis ikatan peptida merupakan reaksi penambahan dan penghilangan, dimana protease yang bertindak sebagai nukleofilik, kemudian berinteraksi sehingga membentuk suatu molekul air (Bauer *et al.*, 1996). Secara umum nukleofilik akan berubah menjadi intermediate tetrahedral dengan atom karbonil pada ikatan peptida, kemudian satu gugus amina dikeluarkan dari sisi aktifnya, dan diganti dengan satu molekul air. Pada protease jenis tertentu, adisi enzim-asil dapat dibentuk, seperti pada gambar 2.2 intermediate tetrahedral yang terakhirnya

akan menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang dapat diregenerasi (Moran *et al.*, 1994).

Palmer (1991) menjelaskan berdasarkan cara kerjanya, protease dibagi menjadi dua, yang pertama yaitu proteolisis terbatas yaitu proteolisis yang dapat memecah satu ikatan peptida yang berada dalam protein target, kemudian yang kedua yaitu proteolisis tak terbatas yaitu proteolisis yang dapat mendegradasi protein menjadi asam amino berdasarkan penyusunnya. berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida, enzim protease dibedakan menjadi menjadi dua bagian, yaitu endopeptidase atau proteinase (EC 3,4,21-99) dan eksopeptidase (EC 3.4.11-21). Endopeptidase dapat memutuskan ikatan peptida yang berada didalam rantai protein dan dapat menghasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase dapat menguraikan protein yang berada di bagian ujung rantai kemudian menghasilkan satu asam amino dan sisa peptida.

Protease merupakan enzim yang sangat selektif untuk menghidrolisis ikatan peptida yang terkandung dalam substrat. Ada 2 jenis pembagian enzim protease, yaitu protease yang dapat memotong bagian ujung substrat yang disebut dengan eksopeptidase, kemudian yang dapat memotong ikatan peptida pada bagian tengah disebut dengan endopeptidase. Protease dapat dikalsifikasikan berdasarkan pH asam, netral dan basa (Susanti, 2017).

Protease dibagi menjadi empat bagian berdasarkan penyusunnya, antara lain (Whittaker, 1994 dan Rao, *et al.*, 1998) :

- a) Protease serin merupakan kelompok enzim yang memiliki serin di sisi aktif nya. Protease serin memiliki meknisme katalitik yang ditandai

dengan residu reaktif tertentu. Protease serin dapat aktif pada pH netral sekitar 7,0 dan pH basa sekitar 11,0 (Susanti, 2003). Contoh protease serin adalah tripsin, kimotripsin dan elastase (Fersht, 1985).

- b) Protease sistein dapat bekerja optimal pada pH netral. Enzim ini dapat diproduksi oleh hampir semua organisme hidup. Secara umum protease sistein hanya dapat bekerja ketika terdapat reduktor yaitu HCN atau sistein (Susanti, 2017)
- c) Protease aspartat juga merupakan protease asam, protease jenis ini dapat bekerja secara optimum pada pH rendah, aktivitas katalitik protease aspartat bergantung pada residu asam aspartat itu sendiri. Protease aspartat dapat dihambat oleh pepstatin. Protease jenis ini mempunyai residu terhadap asam amino aromatik. Contoh enzim ini adalah kelompok pepsin yang meliputi enzim-enzim pencernaan seperti pepsin, kimosin dan renin (Ward, 1985).
- d) Metalloprotease merupakan enzim yang memerlukan kation divalen. dalam mekanisme katalitik enzim protease jenis ini memerlukan logam jenis Zn^{2+} sebagai kofaktornya (Sadikin, 2002). kelompok metalloprotease Zn, merupakan salah satu kelompok protease yang sering ditemukan pada bakteri dan jamur.

Protease merupakan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang umumnya dipakai dalam bidang industri. Beberapa kelebihan yang didapatkan dalam memanfaatkan bakteri sebagai penghasil enzim protease yaitu dapat diproduksi dengan mudah pada skala yang besar, waktu produksi yang dibutuhkan

dalam menghasilkan enzim relatif cepat dan dapat dikembangkan secara berkelanjutan dan biaya yang dibutuhkan hanya sedikit (Thomas, 1984). Selain itu mikroorganisme juga mudah tumbuh dengan menggunakan substrat yang murah (Whittaker, 1894).

Keberadaan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim merupakan salah satu tanda kebesaran Allah SWT bagi manusia yang mau berfikir. Al-Qur'an telah menjelaskan dalam surat Al-Baqarah [2] ayat 164 yang berbunyi :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ وَالْعُلُوكِ 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

Artinya : “Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang, bahtera yang berlayar dilaut membawa apa yang berguna bagi manusia, dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air, lalu dengan air itu dihidupkan-Nya bumi sesudah mati (kering), dan Dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan, dan pengisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi, sungguh (terdapat) tanda-tanda (kebesaran dan kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkannya” (Q.S Al-Baqarah: 164)

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu yang bermanfaat bagi makhluk-Nya, dan Allah SWT juga menyebarkan segala macam hewan di muka bumi sebagai tanda-tanda kebesaran-Nya bagi manusia yang mau berfikir untuk memanfaatkannya. Dimana manfaat itu bisa dicari oleh manusia, antara lain yang dapat dimanfaatkan oleh manusia yaitu enzim. Enzim baik digunakan untuk proses metabolisme dalam tubuh maupun luar tubuh. Salah satu enzim yang sering digunakan yaitu enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri yang merupakan suatu tanda kebesaran Allah yang dapat

dimanfaatkan oleh umat manusia untuk memenuhi kebutuhan hidupnya serta dapat meringankan beban umat manusia yang dapat dimanfaatkan dalam bidang industri.

Berdasarkan Kitab Tafsir Ibnu Katsir (2013) bahwa segala sesuatu yang Allah SWT turunkan ke bumi merupakan pembuktian tentang keberadaan sang Pencipta. Allah SWT sebarkan di bumi segala jenis hewan dengan bermacam-macam bentuk, warna, dan manfaat.

Contoh mikroba yang dapat menghasilkan suatu enzim yang dapat digunakan untuk bahan pangan dan bahan industri yaitu *Aspergillus niger*, *A.oriza*, *A.awamori*, *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis*, *B.licheniformis*, dan *Saccaromyces cereviceae* (Nagodawithana dan reed, 1993). Dari spesies diatas telah banyak dimanfaatkan dalam bidang industri, bahkan saat ini telah banyak dilakukan mutasi gen untuk mendapat enzim yang sesuai dan dilakukan seleksi mikroba untuk menghasilkan enzim yang lebih baik lagi (Chaplin dan Bucke, 1990).

Efektivitas kerja enzim protease terhadap protein dapat ditentukan oleh beberapa struktur protein itu sendiri atas : 1) struktur primer yang merupakan suatu deretan asam amino pada protein, 2) Struktur skunder merupakan derajat yang dapat membentuk struktur sultur alfa dan beta, serta struktur acak, 3) struktur tersier, interaksi antar gugus alkil (R) satu sama lain, 4) struktur kuarterner merupakan asosiasi antar sub unit molekul protein (Suhartono, 1989).

2.3 Aplikasi Enzim Protease

Protease merupakan suatu enzim yang dihasilkan oleh suatu bakteri yang memiliki nilai ekonomis tinggi karena dapat digunakan untuk berbagai macam

produk. Enzim ini berperan penting dalam industri makanan (Saefudin, 2006). Oleh sebab itu tidak bisa dipungkiri bahwa protease yang dibutuhkan dalam bidang industri mencapai 60% dari total enzim yang diperjual belikan didunia (Ward, 1985).

1) Industri detergen

Enzim protease dapat digunakan pada detergen dengan beberapa syarat, antara lain harus memiliki karakteristik yang sesuai untuk pembuatan detergen, antara lain pH yang digunakan harus pH basa, suhu yang digunakan harus sesuai, tahan terhadap senyawa pengoksidasi dari pengkeat, serta memiliki spesifitas yang luas dan memproduksi detergen tersebut (Ward,1983). Menurut Sulisty (1999) protease merupakan enzim utama yang digunakan dalam deterjen. Enzim ini berfungsi untuk menghidrolisa noda protein pada baju yang terkena noda seperti darah dan keringat.

2) Industri kulit

Enzim protease digunakan dalam industri kulit dikarenakan enzim protease dapat membantu untuk menghilangkan bulu yang masih menempel pada kulit serta mampu menghidrolisis sebagian protein yang terdapat dalam kulit sehingga tekstur kulit yang awalnya keras menjadi lunak dan mampu mengurangi pereaksi sulfida, sehingga dapat mengurangi limbah bersulfur (Suhartono, 1989).

3) Industri kue

Enzim protease dalam industri kue digunakan untuk mempercepat waktu pengembangan, hal ini dikarenakan enzim protease dapat menghidrolisis ikatan peptida pada interior gluten. Enzim protease mampu melepaskan asam amino dari gluten yang bereaksi dengan gula selama pembakaran roti berlangsung, sehingga roti yang dibakar menimbulkan aroma yang diinginkan serta warna yang muncul dapat sesuai dengan keinginan (Suhartono, 1989).

4) Industri keju

Protease juga digunakan dalam industri keju, hal ini dikarenakan enzim protease dapat digunakan untuk menggumpalkan susu, yaitu dengan proses yang pertama menghilangkan air, laktosa serta beberapa mineral dari susu (Suhartono, 1989).

5) Industri bir

Enzim protease digunakan untuk proses pembuatan bir yang berfungsi untuk mendegradasi molekul gluten untuk mengurangi kandungan gluten bir yang terbuat dari barley, sementara yang tidak menggunakan barley enzim digunakan untuk mengubah pati menjadi gula (Morgan, 2013).

6) Industri daging

Daging sendiri merupakan kumpulan dari jaringan otot dan ikat yang terdiri atas protein-protein. Protein sendiri merupakan gabungan dari banyak asam amino dan dihubungkan dengan rantai peptida untuk membuat molekul yang lebih besar, sehingga untuk melunakkan daging

dibutuhkan enzim protease, karena enzimprotease mampu memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Seperti contoh buah nenas yang mampu melunakkan daging, hal ini dikarenakan didalam buah nenas terdapat enzim protease (Indrawan, 2015).

2.4 Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Seperti halnya dengan protein yang lainnya, aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh beberapa kondisi, antara lain kondisi lingkungan. Kondisi lingkungan yang tidak sesuai dapat mempengaruhi hasil enzim, sehingga enzim yang dihasilkan kurang optimal dan kerja enzim dapat terganggu. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas kerja enzim antara lain konsentrasi dan jenis substrat yang digunakan, pH yang sesuai, suhu, serta senyawa aktifator dan inhibitor (Hames dan hooper, 2005). Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas kerja enzim, antara lain :

1) Suhu

Enzim memiliki rentang suhu tertentu untuk dapat bekerja dengan optimal. Suhu dapat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Pada suhu rendah enzim dapat menurunkan aktivitasnya dan reaksinya menjadi lambat, sedangkan pada suhu tinggi aktivitas enzim akan meningkat, sehingga reaksi enzimatis akan mencapai optimum.

Kenaikan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penurunan reaksi enzimatis (Wuryanti, 2004). Bahkan dapat menghentikan reaksi tersebut. Hal ini dikarenakan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan

kerusakan enzim baik secara keseluruhan maupun sebagian, terutama sisi aktifnya. Pada suhu 0°C enzim tidak bisa aktif, tetapi enzim bisa aktif ketika suhu telah kembali normal (Lehninger, 1997).

Peningkatan suhu dapat mempengaruhi energi kinetik molekul sehingga terjadi kontak antara substrat dan enzim dan mampu menghasilkan aktifitas yang lebih tinggi (Suhartono, 1989). Tetapi jika suhu yang digunakan terlalu tinggi maka protein dalam enzim akan terdenaturasi (Martin, *et all.*, 1983). Utarti, *et all.*, (2009) menjelaskan bahwa aktivitas protease yang berasal dari strain *bacillus* sp 31 meningkat secara optimum pada suhu 60°C sebanyak 146,40 U/ml selanjutnya pada suhu 70°C dan 80°C aktivitas menjadi menurun dengan nilai aktivitas sebesar 127,70 U/ml dan 80,30U/ml, selain perubahan pH dapat perubahan pada reaksi yang dikatalis oleh enzim (Murray *et all.*, 2003).

2) Konsentrasi Substrat

Aktivitas kerja suatu enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang tersedia, jika konsentrasi substrat yang digunakan sesuai maka dapat meningkatkan kecepatan reaksi, dan ketika jumlah konsentrasi substrat yang digunakan terlalu banyak maka dapat mengurangi kecepatan reaksi enzimatik, hal ini dikarenakan sisi aktif enzim telah jenuh (Fifendi, 2017).

Konsentrasi substrat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme harus seimbang. Keseimbangan yang terjadi antara substrat dan enzim dapat menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu dalam dengan keadaan yang seimbang. Konsep keseimbangan yang terjadi di alam semesta telah dijelaskan oleh Allah SWT dalam Al-Qur'an surat Al-Mulk [67] ayat 3, yang berbunyi :

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا ۗ مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ ۗ فَارْجِعِ الْبَصَرَ هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ

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?"

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu secara seimbang. Hal ini sesuai dengan Al-Mahalli dan As-Suyuti (2008) yang mengatakan bahwa tidak ada satu pun yang diciptakan oleh Allah SWT di alam semesta ini dalam keadaan yang tidak seimbang.

Hal ini terjadi pada keseimbangan pada substrat yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri untuk menghasilkan suatu enzim yang dapat digunakan untuk meringankan beban hidup manusia. Keseimbangan substrat akan mempengaruhi laju reaksi, dimana aktivitas enzim dipengaruhi oleh jumlah substrat yang tersedia. Karena semakin banyak jumlah substrat yang tersedia, maka semakin banyak pula substrat yang menempati sisi aktif enzim. Apabila jumlah substrat yang digunakan terlalu banyak maka enzim akan mengalami kejenuhan.

3) pH

pH termasuk dalam faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas suatu enzim dan struktur enzim (Nelson dan Cox, 2005). Karakteristik pH dapat menunjukkan aktivitas katalitik maksimum yang biasanya disebut dengan pH maksimum. Perubahan pH yang ekstrim dapat menyebabkan protein terdenaturasi (Murray *et al.*, 2003). pH optimum yang dibutuhkan oleh genus *Bacillus* sp untuk menghasilkan enzim protease ekstraseluler bervariasi yaitu antara pH 8-10 (Soeka dan Sulityani, 2014).

Struktur ion pada enzim bergantung pada pH lingkungan, karena enzim dapat membentuk ion positif dan ion negatif atau bermuatan ganda (*Zwitter ion*). pH rendah atau pH tinggi dapat menurunkan efektivitas suatu enzim, oleh karena itu enzim mempunyai pH optimum yang tidak sama bergantung dengan substrat dan spesies mikroorganisme yang digunakan (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).

4) Ada tidaknya aktivator dan inhibitor

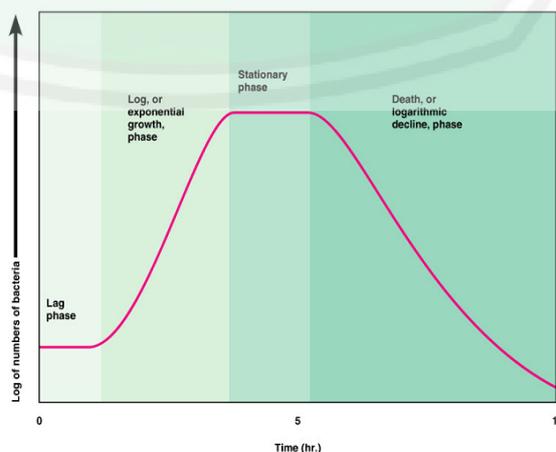
Kecepatan laju reaksi enzimatik dapat dipengaruhi oleh keberadaan ion logam (Suhartono, 1989). Fungsi ion logam dalam aktivitas enzim yaitu sebagai aktivator maupun inhibitor. Sejumlah enzim membutuhkan suatu komponen lain yang berfungsi sebagai katalis. Komponen ini dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut dengan koenzim (Martoharsono, 1997). Aktivator umumnya berupa ion-ion logam yang dapat berikatan dan mudah terlepas dari enzim. Contoh aktivator logam adalah K^+ , Mn^+ , Mg^+ , Cu^+ atau Zn^+ (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994). Mekanisme ion logam dapat memperbesar aktivitas enzim yaitu menjadi bagian integral dari sisi aktif, merubah konstanta kesetimbangan dari reaksi enzimatik dan dapat merubah muatan listrik (Richardson, 1985). Inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas kerja enzim. Umumnya inhibitor bekerja dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat yang membuat fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1989).

5) Waktu Inkubasi

Lama waktu inkubasi yang untuk setiap mikroorganismenya menghasilkan suatu enzim membutuhkan waktu yang berbeda-beda. Pada umumnya waktu untuk memproduksi enzim optimal terjadi pada fase logaritmik atau eksponensial (Brock, *et al.*, 2004). Pertumbuhan mikroorganismenya dapat berpengaruh terhadap produksi enzim, dikarenakan mikroba dapat menghasilkan enzim pada fase tertentu. Sedangkan produksi enzim dapat menurun, hal ini dikarenakan oleh pertumbuhan sel mikroorganismenya yang mengalami penurunan ketika nutrisi yang berada di dalam substrat telah habis, dikarenakan waktu inkubasi terlalu lama. (Agustine, 2005).

2.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan mikroba merupakan suatu gambaran sejak awal masa pertumbuhan dan perkembangan sampai berhentinya masa pertumbuhan mikroba tersebut. Kurva ini terbagi ke dalam beberapa fase yaitu fase adaptasi, fase *lag*, fase stasioner dan fase kematian (Waluyo, 2007).



GAMBAR 2.3 kurva pertumbuhan bakteri (Volk and Wheeler 1988).

Kurva pertumbuhan pada mikroorganisme dimulai dari fase awal (lag), fase lag merupakan fase penyesuaian diri mikroba terhadap lingkungannya, fase ini berkisar antara satu jam hingga beberapa hari. Pada fase ini mikroorganisme beradaptasi dengan lingkungan dan belum mampu untuk mengandakan pembiakan. Setelah melewati fase lag mikroba mulai terjadi reproduksi seluler, mula-mula pertumbuhan secara perlahan kemudian semakin lama akan mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, hal ini dikarenakan mikroba telah menyesuaikan diri dengan substrat dan nutrisi yang terkandung masih banyak, sehingga pertumbuhan mikroba berlangsung cepat dan fase ini disebut dengan fase logaritmik atau eksponensial (Putranto, 2006).

Fase ketiga merupakan fase stasioner, fase ini merupakan fase pertumbuhan mikroorganisme yang stabil dengan laju pertumbuhan yang spesifik (μ) konstan, sehingga dalam kurva pertumbuhan bakteri terlihat garis lurus (Panji, *et al.*, 2002). Setelah melewati fase stasioner bakteri mengalami pertumbuhan yang konstan, setelah nutrisi yang terkandung dalam substrat yang digunakan mikroba telah habis maka pertumbuhannya akan menurun. Fase kematian ditandai oleh menurunnya pertumbuhan mikroorganisme, pada fase ini laju kematian lebih tinggi dibandingkan dengan laju pertumbuhan. Hal ini dikarenakan jumlah nutrisi telah habis (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Enzim dapat diproduksi secara efektif yaitu ketika pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial. Pada saat mikroba memasuki masa eksponensial mikroba sangat aktif dalam mensintesis enzim untuk keberlangsungan hidupnya. (Sulistyaningtyas, *et al.*, 2013). Waktu optimum untuk memproduksi enzim

protease adalah saat akhir fase eksponensial atau saat akan memasuki fase stasioner (Ferdian, 2006).

Faktor utama yang harus diperhatikan pada saat proses fermentasi suatu enzim yaitu melakukan seleksi mikroba terlebih dahulu untuk mendapatkan spesies mikroba yang sesuai, kondisi fermentasi dan siklus pertumbuhan harus diperhatikan. Seleksi mikroba harus dilakukan terlebih dahulu, sehingga mikroba dapat cepat tumbuh dan digunakan untuk menghasilkan enzim dalam jumlah yang cukup besar. Kondisi yang harus diperhatikan pada saat fermentasi yaitu pH, suhu, transfer oksigen dan nutrisi yang terkandung dalam substrat yang dibutuhkan oleh suatu mikroba untuk menghasilkan enzim yang sesuai, khususnya substrat yang banyak mengandung karbon, nitrogen, fosfor, belerang dan garam-garam mineral.

Aunstrup (1979) menjelaskan untuk menghasilkan enzim protease harus memperhatikan beberapa hal yaitu, yang pertama seleksi mikroorganisme atau seleksi galur dan kondisi lingkungan yang akan digunakan. Seleksi galur yang dimaksud yaitu untuk mendapatkan galur yang sesuai untuk menghasilkan enzim protease yang tinggi, sedangkan kondisi lingkungan dilakukan untuk mengoptimalkan pertumbuhan mikroorganisme untuk menghasilkan enzim protease. Menurut Ward (1983), faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba dalam menghasilkan enzim yaitu pH, komposisi media yang digunakan, kondisi aerob atau anaerob.

Untuk mengetahui banyak nya sel mikrobayang berada didalam media, maka dilakukan pengukuran kekeruhan terhadap media pertumbuhan. Kekruhan

dapat terjadi ketika mikroorganisme mengalami pertumbuhan dan mensekresikan enzim kedalam media yang telah disediakan. Kekeruhan dalam media dapat diukur menggunakan turbiditas pada medium dengan panjang gelombang tertentu. Absorbansi yang terukur tidak hanya mengukur jumlah sel hidup, tetapi sel yang mati juga ikut terukur (Susanti dan Ariani, 2003).

Pertumbuhan mikroorganisme dapat diketahui dari bertambahnya jumlah sel (berat kering sel). Pada dasarnya mikroba dapat membelah dari satu sel menjadi dua sel dan kelipatan selanjutnya, sehingga pertumbuhan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel. Pertumbuhan suatu mikroorganisme yang satu dengan mikroorganisme yang lain selalu berbeda, ada yang membutuhkan waktu hanya beberapa menit sampai beberapa jam bergantung kecepatan pertumbuhan suatu mikroba tersebut. Kecepatan pertumbuhan sendiri merupakan perubahan jumlah massa sel per unit satuan waktu (Sumarsih, 2003).

Bakteri mampu bertahan hidup yaitu dengan cara menghidrolisis suatu substrat yang mengandung protein untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dalam mempertahankan kelangsungan hidupnya. *Bacillus subtilis* merupakan suatu bakteri yang mampu menghasilkan enzim protease, enzim protease mampu memecah protein menjadi asam amino. Enzim protease merupakan salah satu bentuk rezeki yang diberikan oleh Allah SWT untuk makhluknya melalui suatu bakteri yaitu *bacillus subtilis* yang mana enzim protease sangat dibutuhkan dalam metabolisme tubuh makhluk hidup yang berguna sebagai biokatalisator dalam memecah protein menjadi senyawa yang lebih sederhana. Allah SWT telah menjelaskan dalam Al-Qur'an bahwa Allah SWT telah menjamin rizki seluruh

mahluknya yang ada dibumi, sebagaimana dalam Al-Qur'an surat Hud [11] ayat 6 yang berbunyi :

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

Artinya “Dan tidak ada suatu binatang melatapun dibumi melainkan Allah-lah yang memberi rezekinya, dan dia mengetahui tempat berdiam binatang itu dan tempat penyimpanannya. Semua tertulis dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfudz)” (QS.AL-Hud:6).

Menurut Al-Qarni (2007), ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT memberi dan menjamin rezki 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 dimuka bumi telah ditentukan oleh takdir Allah SWT. Oleh karena itu tidak satupun makhluk ciptaan-Nya yang terlupakan. Seperti bakteri *Bacillus subtilis* yang diciptakan Allah SWT dengan memiliki kemampuan yaitu dapat menghidrolisi protein yang berada didalam substrat yang digunakan untuk kelangsungan hidupnya.

2.6 Pengujian Aktivitas Protease

Aktivitas enzim protease dapat diukur dengan menggunakan metode Bregmeyer dan Grassal (1983). Dalam metode ini substrat yang digunakan yaitu kasein. Kasein dapat dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air yang akan diubah menjadi peptida dan asam amino. Allah berfirman dalam Al-Qur'an surat Adz-Dzariyaat (51) ayat 49 yang berbunyi :

وَمِنْ كُلِّ شَيْءٍ خَلَقْنَا زَوْجَيْنِ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ

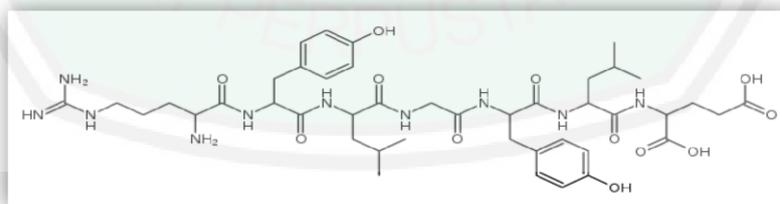
Artinya : “Dan segala sesuatu kami ciptakan berpasang-pasangan supaya kamu mengingatkan kebesaran Allah”.

Ibnu Katsir (2003) dalam tafsirnya menjelaskan bahwa seluruh makhluk telah diciptakan berpasang-pasangan, antara lain terdapat langit dan bumi, terjadinya siang dan malam, matahari dan bulan, darat dan lautan, terang dan gelap, iman dan kufur, kematian dan kehidupan, kesengsaraan dan kebahagiaan, dan begitu pula terdapat surga dan neraka.

Allah SWT menciptakan segala sesuatu secara berpasang-pasangan. Seperti halnya dengan diciptakannya laki-laki dengan perempuan, siang dengan malam, begitupun dengan rasa yaitu manis dengan pahit. Begitupun dengan enzim, enzim diciptakan oleh Allah SWT dengan pasangannya yaitu substrat, hal ini dikarenakan jika suatu bakteri tidak sesuai dengan substrat yang digunakan maka tidak akan menghasilkan enzim yang diharapkan, sehingga untuk mendapatkan enzim yang sesuai maka harus menggunakan substrat yang sesuai (Pelczar dan Chan, 1988).

Kasein merupakan suatu protein yang terdapat dalam susu yang memiliki susunan asam amino yang terdiri dari Arginin (Arg) – Tirosin (Try) – Leusin (Leu) – Glisin (Gly) – Tirosin (Try) – Leusin (Leu) – Asam Glutamat (Glu)

Gambar (2.4) (Panic, 2017).



Gambar 2.4 Struktur Kasein (Panic, 2017)

Aktivitas protease ditentukan dengan mengukur kadar asam amino sebagai produk hidrolisis protein dalam susu skim oleh enzim protease (Soeka dan Sulistyani, 2014). Aktivitas protease diukur dengan mengikuti metode Bergmeyer dan Grassl (1983) seperti tabel dibawa ini :

Prinsip kerja dari metode Bergmeyer dan Grassl (1983) yaitu pengukuran asam amino tirosin yang telah terhidrolisis dan dipisahkan dari substratnya. Pada mulanya enzim mampu memecah substrat kasein menggunakan bantuan air sehingga menjadi asam amino dan peptida, kemudian laju pembentukan peptida akan menjadi tolak ukur terhadap aktivitas katalis protease. Selanjutnya, kasein yang telah terhidrolisis menghasilkan asam amino, selanjutnya ditambahkan TCA (*Trichloroacetic acid*). Penambahan TCA berfungsi untuk menginaktifkan protease pada saat waktu inkubasi protease. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm untuk memisahkan asam amino dan peptida yang mengendap dengan substrat terbentuk selama waktu inkubasi berlangsung. Setelah itu ditambahkan larutan tirosin, kemudian tirosin yang larut dalam filtrat akan bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu dan menghasilkan warna biru. Untuk mendapatkan pH sekitar 11,5 maka ditambahkan Na_2CO_3 berfungsi untuk merubah pH menjadi optimum sehingga menghasilkan intensitas warna biru kemudian dapat diukur serapannya dengan menggunakan panjang gelombang 578 nm. Besarnya serapan ini berbanding lurus dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis. Satuan aktivitas protease adalah unit. Poedjiadi (2012) menjelaskan bahwa Satuan unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya ml enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 mol tirosin tiap menit. Tirosin merupakan molekul asam amino yang mempunyai gugus fenol dan bersifat asam lemah. Tirosin digunakan sebagai larutan standar untuk menguji aktivitas protease dan untuk mengukur aktivitas protease dalam memecah protein menjadi asam amino (Sulastri, 2008).

Prinsip kerja metode Bergmeyer dan Grassl (1983) yaitu kasein yang berfungsi sebagai substrat akan dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino dengan rumus reaksi seperti dibawah ini :



Aktifitas protease dihitung dalam satuan PU (Protease Unit) per ml ekstrak enzim.

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

Keterangan :

PU : Unit Aktivitas Protease (Unit/ml)

Asp : Nilai Absorbansi Sampel

Ast : Nilai Absorbansi Standar

Abl : Nilai Absorbansi Blangko

P : Faktor Pengenceran

T : Waktu (Menit)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan penelitian

Rancangan penelitian pada penelitian kali ini yaitu dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari 2 faktor perlakuan dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama yang digunakan adalah konsentrasi substrat Kasein yang terdiri dari 3 konsentrasi yang berbeda yaitu (0,5%, 1%, 1,5% dan 2%) dan faktor kedua yaitu Lama waktu inkubasi yang dilakukan selama (30 menit, 40 menit dan 50 menit).

a. Faktor Pertama : konsentrasi substrat

K1 : Konsentrasi substrat 0,5 %

K2 : Konsentrasi substrat 1 %

K3 : Konsentrasi substrat 1,5 %

K4 : Konsentrasi substrat 2 %

b. Faktor Kedua : Lama waktu inkubasi

L1 : Lama waktu inkubasi 30 menit

L2 : Lama waktu inkubasi 40 menit

L3 : Lama waktu inkubasi 50 menit

Berdasarkan kedua faktor yang digunakan dalam penelitian kali ini, maka diperoleh kombinasi perlakuan sebagai berikut :

Konsentrasi substrat(K)	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %
Lama inkubasi (L)				
30 menit	K1L1	K2L1	K3L1	K4L1
40 menit	K1L2	K2L2	K3L2	K4L2
50 menit	K1L3	K2L3	K3L3	K4L3

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

$$\begin{aligned}
 (T-1) (R-1) &\geq 15 && \text{Keterangan :} \\
 (12-1) (R-1) &\geq 15 && T = \text{Jumlah Perlakuan} \\
 12R - 12 - R + 1 &\geq 15 && R = \text{Jumlah Pengulangan} \\
 11R - 11 &\geq 15 && 15 = \text{Derajat Bebas untuk} \\
 &&& \text{RAL} \\
 R &\geq (15+11)/11 \\
 R &\geq 2,363 = 3
 \end{aligned}$$

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2018 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian kali ini yaitu sebagai berikut :

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian kali ini yaitu perlakuan konsentrasi substrat (0,5%, 1%, 1,5% dan 2%) dan lama waktu inkubasi (30 menit, 40 menit dan 50 menit).

3.3.2 Variabel Terikat

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

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi, rak tabung, cawan petri, pipet, erlenmeyer, gelas ukur, *beaker glass*, *vortex mixer*, *shaker incubator*, spatula, sentrifuse, autoklaf, timbangan analitic, jarum ose, hot plate, mikropipet, bunsen, inkubator, sentifuse, spektrofotometer dan LAF.

3.4.2 bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian kali ini yaitu Aquades, NA (Nutrien Agar), media selektif susu skim agar (SMA), larutan TCA 0,1 mol/L, *Tyrosin standart* 5 mmol/L, Na_2CO_3 0,4 mol/L, pereaksi Folin Ciocalteau, buffer Borat 0,01M (pH 8), CaCl_2 12 mmol/L, alumunium Foil, Na_2CO_3 (0,4 M) dan ekstrak enzim protease.

3.5. Prosedur penelitian

3.5.1 Pembuatan media

3.5.1.1 Pembuatan media Agar Nutrien (NA)

Sebanyak 10 g NA bubuk dilarutkan dalam 500 ml aquades dan dihomogenkan diatas *hot plate* dengan bantuan *stirrer*, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sebagian media NA yang telah homogen dituang ke dalam tabung reaksi untuk memelihara isolat dalam media agar miring, kemudian sebanyak 15-20 ml media NA ditungkan kedalam cawan petri steril (Soeka dan sulistiani, 2014).

3.5.1.2 Media produksi Protease

Media produksi protease yang digunakan dalam penelitian kali ini yaitu dengan media NB sebanyak 5 g dengan 250 ml aquades. Kemudian disterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Yuniati, 2015).

3.5.2 Peremajaan Isolat *Bacillus subtilis*

Sebanyak 1 ose isolat bakteri *Bacillus subtilis* diinokulasikan pada media Na miring sebagai *stock culture* kemudian di inkubasi selama pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Soeka dan Sulistiani, 2014).

3.5.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*

Sebanyak 5 ose isolat bakteri *Bacillus subtilis* diinokulasikan pada media media NB sebanyak 5 gram dengan 250 aquades. Kemudian disterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah mencapai suhu ruang diletakkan dalam shaker incubator dengan kecepatan 200 rpm suhu 37⁰C. 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).

3.5.4 Uji kualitatif protease

Isolat *Bacillus subtilis* ditumbuhkan pada media SMA (Skim Milk Agar) yang dibuat dari 3 g susu skim bubuk dan 1 gr agar dilarutkan dalam 150 ml akuades, kemudian disterilkan pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebanyak 10 µL isolat diteteskan diatas kertas cakram yang diletakkan diatas media SMA lalu di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Baehaki, 2012). 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). Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan diameter areal bening dengan diameter koloni bakteri (Baehaki, 2011).

3.5.5 Uji Kuantitatif Protease

3.5.5.1 Produksi Enzim protease

Diambil sebanyak 5 ujung ose diambil inokulum dan diinokulasikan dalam 250 ml media NB sebanyak 5 gram. Kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 37⁰C selama akhir fase logaritmik dan awal fase stasioner (Yuniati, 2015). Untuk menghasilkan ekstraksi enzim dilakukan dengan menggunakan sentrifugasi pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Kemudian filtrat yang telah memisah dari pelet diambil. Filtrat ini merupakan enzim kasar. Enzim protease

kasar selanjutnya diuji aktivitasnya dengan metode Bergmeyer (1983).

3.5.5.2. Pengukuran Pengaruh Konsentrasi substrat dan Pengaruh lama waktu inkubasi.

Aktivitas proteolitik dari enzim yang dihasilkan diukur dengan metode Bergmeyer (1983). Tiga tabung disiapkan, masing-masing untuk blanko, standar dan sampel. Sebanyak 1 ml buffer borat pH 8 (0,01 M) dimasukkan dalam masing-masing tabung. Dilanjutkan dengan pemberian 1 ml substrat kasein dengan konsentrasi 0,5%, 1 %, 1,5 % dan 2% (Ph 8), kemudian pada tabung sampel diisi enzim dalam CaCl sebanyak 0,2 ml, kemudian pada tabung standar diisi dengan 0,2 ml tyrosin (5mM), tabung blanko diisi dengan aquades 0,2 ml, kemudian ketiga tabung diinkubasi dalam shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm selama 30 menit , 40 menit dan 50 menit pada suhu 55⁰ C.

Kemudian ketiga tabung ditambah 2 ml TCA (0,1 M). Kemudian larutan CaCl (2mM) sebanyak 0,2 ml dimasukkan kedalam tabung sampel, sedangkan tabung blangko dan standar masing-masing diberi 0,2 ml enzim kasar dalam CaCl₂ (2mM). Ketiga tabung didiamkan pada suhu 37⁰C selama 10 menit, lalu diputar dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.

Kemudian diambil sebanyak 1,5 ml filtrat dari ketiga tabung dan ditambahkan 5 ml Na₂CO₃ (0,4 M) untuk

mendapatkan pH sekitar 11,5 sebagai pH optimum dan mempertahankan intensitas dan stabilitas warna biru dan 1 ml reagen Folin Ciocalteau yang akan bereaksi dengan tyrosin yang telah larut dalam filtrat dan membentuk kompleks warna biru. 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 dibawah ini dapat dihitung unit aktivitas 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 µmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Baehaki, 2011).

3.6 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 konsentrasi substrat dan lama waktu inkubasi terhadap aktivitas protease dianalisis dengan menggunakan Analysis Of Variance (ANOVA). Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter maka dilanjutkan dengan Uji Duncan Multiple Test (DMRT).



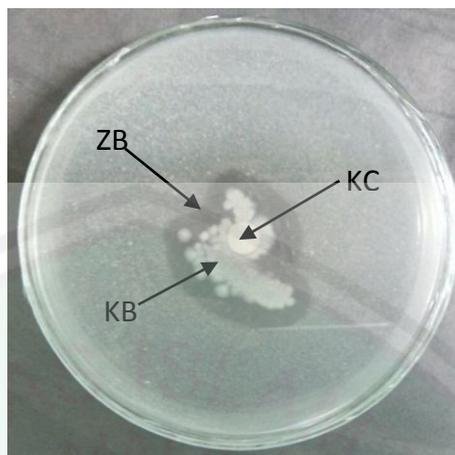
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Uji kualitatif enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* bertujuan untuk mengetahui kemampuan yang dimiliki oleh bakteri *Bacillus subtilis* dalam menghasilkan enzim protease dengan cara menghidrolisis protein yang berada di dalam media *Skim milk agar* (SMA) yang awalnya berwarna putih menjadi bening. Aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dapat diketahui dengan uji kualitatif dengan ada tidaknya zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri yang ditumbuhkan dalam media Skim Milk Agar (SMA) (Gouda, 2006).

Aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis* pada media *Skim Milk Agar* (SMA) diukur menggunakan indeks protease (IP) yaitu dengan cara membandingkan antara diameter zona bening disekitar koloni dengan diameter koloni bakteri (Soeka dan Sulistiani, 2014). Hasil pengamatan zona bening dari bakteri *Bacillus subtilis* yang diuji pada media SMA ditampilkan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Cawan 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 disekitar koloni bakteri *Bacillus subtilis* pada (gambar 4.1) menunjukkan bahwa terdapat enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis* . Enzim protease dapat mendegradasi protein yang terkandung dalam media *skim milk agar* (SMA) yaitu dengan cara memutuskan ikatan peptida dengan masuknya air kedalam molekul kemudian berubah menjadi peptida-peptida rantai pendek dan asam-asam amino yang menyebabkan perubahan warna susu menjadi tidak berwarna atau bening (Susanti, 2003). Nilai indeks protease (IP) yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis* yang telah diinkubasi selama 1 x 24 jam dengan suhu 37⁰ C, dari inkubasi tersebut terlihat zona bening yang dapat dihitung indeks proteolitiknya (IP) dengan cara perbandingan antara zona bening 51,21 mm dengan diameter koloni bakteri 40,18 mm, dan dihasilkan IP sebesar 45,69 mm (Perhitungan pada lampiran 2).

Indeks proteolitik yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis* termasuk cukup tinggi, karena indeks proteolitik pada isolat T1SI sebesar 1,1 mm (Baehaki, 2011). Fatchah (2011) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa IP protease pada bakteri *Bacillus mycoides* sebesar 1,79 mm dan hal ini menunjukkan bahwa IP nya lebih besar. IP bisa berbeda dikarenakan spesies yang digunakan berbeda, sehingga mempunyai kemampuan yang berbeda pula dalam menghasilkan protease ekstraseluler yang dapat menghidrolisis kasein dalam media *Skim Milk Agar* (SMA).

4.2 Pola Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dapat diketahui dengan cara mengukur kekeruhan pada media yang digunakan untuk pertumbuhan. Pengukuran kekeruhan pada medium pada selang waktu tertentu dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri tersebut dalam memperbanyak sel (Susanti, 2003). Kurva pertumbuhan hanya mengukur kekeruhan dengan menggunakan spektrofotometer tanpa menghitung jumlah mikroba yang sebenarnya, karena molekul besar yang terdapat didalam media tersebut juga terhitung ketika terkena sinar pada saat penghitungan. Menurut Susanti (2003), kekeruhan terjadi karena sel bakteri mengalami pertumbuhan, berkembang, memperbanyak diri, dan mensekresikan enzim kemedial kultur. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri berfungsi untuk menentukan waktu dimana mikroba memasuki fase akhir logaritmik atau awal fase stasioner, hal ini dilakukan untuk mendapatkan enzim secara maksimal.

Pembuatan kurva pertumbuhan dan media yang digunakan untuk menghasilkan enzim protease dari bakteri *Bacillus subtilis* yaitu dengan

menggunakan media NB, hal ini dikarenakan NB merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrisi.



Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*

Berdasarkan pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* (gambar 4.2) maka diketahui bahwa *Bacillus subtilis* melakukan adaptasi pada fase lag 4 jam, waktu adaptasi tersebut termasuk singkat. Hal ini sesuai dengan penelitian Faizah (2017) yang menjelaskan bahwa fase lag *Bacillus subtilis* yakni 4 jam. Kemudian dijelaskan oleh Kosim (2010) mengatakan bahwa fase log pada bakteri jenis *Bacillus* paling cepat fase adaptasinya yaitu 4 jam. Fase adaptasi sendiri merupakan fase dimana suatu mikroorganisme melakukan penyesuaian diri terhadap lingkuannya, sehingga pertumbuhannya relatif lambat. Dalam fase adaptasi ini sel bakteri telah mengalami pembelahan dengan kecepatan yang sangat rendah dikarenakan bakteri tersebut baru beradaptasi dengan lingkungannya, sehingga fase adaptasi juga disebut dengan fase pertumbuhan awal suatu mikroba.

Fase selanjutnya yang terjadi dalam pertumbuhan bakteri yaitu fase log, fase log merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri relatif cepat, hal ini

terjadi karena pada fase *log* bakteri telah melakukan adaptasi dengan lingkungannya, kemudian pada fase *log* nutrisi yang terkandung dalam media pertumbuhan tercukupi sehingga bakteri mampu mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, pada kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* fase *log* terjadi mulai dari jam ke-8 sampai jam ke-28. Hal ini sesuai dengan Kosim (2010) menjelaskan bahwa fase *log* pada suatu bakteri merupakan fase dimana suatu bakteri mampu tumbuh dengan cepat sampai batas maksimal. Batas maksimal pertumbuhan disebut juga dengan fase eksponensial, dan fase eksponensial terjadi pada jam ke-32. Pada fase eksponensial bakteri lebih banyak membutuhkan nutrisi dibandingkan dengan fase sebelumnya. Pada fase akhir *log* bakteri banyak mengeluarkan zat metabolit yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan tubuhnya. Salah satu zat metabolit yang dikeluarkan yaitu berupa enzim, salah satu enzim yang dikeluarkan yaitu enzim protease. Sehingga untuk memproduksi enzim protease dilakukan pada fase akhir *log* dan awal fase stasioner yaitu pada jam ke-28, karena pada jam tersebut bakteri mampu mensintesis enzim secara maksimal, Ward (1983) menjelaskan bahwa bakteri mampu membentuk enzim secara maksimal yaitu pada fase eksponensial dan lebih meningkat lagi pada awal fase stasioner.

Fase akhir pada pertumbuhan bakteri yaitu fase kematian, fase kematian ditandai dengan dengan menurunnya kurva pertumbuhan, hal ini dikarenakan nutrisi yang terkandung dalam media telah habis, sehingga bakteri berebut untuk mendapatkan nutrisi, dan semakin lama nutrisi tersebut habis sehingga bakteri mengalami kematian, fase ini terjadi pada jam ke-32.

Volk and Wheeler (1988) menjelaskan bahwa pada fase kematian laju kematian lebih cepat dibandingkan dengan laju pertumbuhan. Sedangkan (Faizah, 2017) menjelaskan bahwa fase kematian atau fase penurunan yang terjadi pada bakteri *Bacillus subtilis* yaitu pada jam ke-28. Perbedaan pada kurva pertumbuhan terjadi karena bakteri memiliki fase pertumbuhan yang berbeda beda, bisa dikarenakan perbedaan substrat dan perbedaan jenis bakteri yang digunakan.

الَّذِي خَلَقَ فَسَوَّى ﴿٢﴾ وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ ﴿٣﴾

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) Ayat pertama tersebut yaitu Allah menciptakan makhluk yang berada dimuka bumi ini dan menyempurnakan bentuk yang sebaik-bainya. Menurut tafsir Al-Muyassar (2007) pada ayat ke dua yaitu serta memberikan kemampuan makhluk-Nya sesuai dengan kadar kebutuhannya masing-masing.

Kemampuan hidup suatu bakteri dalam suatu media pertumbuhan tergantung pada ketersediaan nutrisi yang dibutuhkannya. Dalam hal ini bakteri akan menghidrolisis senyawa kompleks yang berada didalam media pertumbuhan menjadi senyawa yang lebih sederhana. Kemampuan bakteri ini merupakan suatu petunjuk bagi manusia atas kebesaran Allah dalam menciptakan makhluk-Nya.

4.3 Pengaruh Interaksi Konsentrasi Substrat dan Lama Inkubasi terhadap aktivitas enzim protease

Enzim merupakan katalisator yang mampu mempercepat laju reaksi tanpa ikut serta dalam reaksi tersebut. Laju reaksi enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain faktor yang dapat

berpengaruh yaitu konsentrasi substrat, lama waktu inkubasi, pH, suhu dan adanya aktivator maupun inhibitor. Salah satu yang paling berpengaruh dalam aktivitas enzim yaitu konsentrasi substrat hal ini dikarenakan semakin banyak substrat yang tersedia maka semakin banyak pula ikatan yang terjadi antara enzim dengan substrat, tetapi jika substrat yang digunakan berlebih maka aktivitas enzim bisa menurun, hal ini dikarenakan enzim tersebut telah jenuh sehingga aktivitas yang dihasilkan menurun (Chen dan Ramos, 2010).

Terdapat beberapa parameter yang dapat diukur dalam penentuan waktu optimum untuk menghasilkan enzim yang maksimal yaitu kerapatan dan aktivitas enzim yang dihasilkan. Dalam hal ini enzim yang dihasilkan yaitu enzim protease yang dihasilkan dari bakteri endofit *Bacillus subtilis*, Aktivitas enzim dapat didefinisikan sebagai kecepatan pembentukan suatu produk pada kondisi optimum (Lehninger, 1993). Penentuan aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* dilakukan dengan variasi konsentrasi substrat dan lama inkubasi untuk mendapatkan konsentrasi substrat dan lama inkubasi yang optimum.

Aktivitas enzim protease dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain yaitu konsentrasi substrat. Dengan menggunakan konsentrasi substrat yang berbeda dari 0,5%, 1%, 1,5% dan 2% dapat diketahui bahwa aktivitas enzim mampu bekerja optimum dengan konsentrasi substrat 1,5 dengan menggunakan analisis Varians diketahui bahwa nilai F hitung lebih besar dari f tabel sehingga konsentrasi substrat berpengaruh dengan

menghasilkan aktivitas enzim protease sebesar 10,998 U/ml. Aktivitas kerja suatu enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang tersedia, Konsentrasi substrat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme harus seimbangan (Fifendi, 2017).

Selain konsentrasi substrat lama waktu inkubasi juga dapat mempengaruhi aktivitas kerja enzim. Dengan menggunakan lama waktu inkubasi yang berbeda dari 30 menit, 40 menit dan 50 menit dapat diketahui bahwa aktivitas enzim mampu bekerja optimun dengan lama waktu inkubasi 40 menit dengan menggunakan analisis Varians diketahui bahwa nilai F hitung lebih besar dari f tabel sehingga konsentrasi substrat berpengaruh dengan menghasilkan aktivitas enzim protease sebesar 10,998 U/ml. Aktivitas kerja suatu enzim dipengaruhi lama waktu inkubasi yang untuk setiap mikroorganisme menghasilkan suatu enzim membutuhkan waktu yang berbeda-beda. Pada umumnya waktu untuk memproduksi enzim optimal terjadi pada fase logaritmik atau eksponensial (Brock, et al., 2004).

Adanya pengaruh konsentrasi substrat, lama inkubasi dan interaksi antara keduanya faktor tersebut terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* dapat diketahui dengan menggunakan analisis statistika berupa ANOVA (*Analysis Of Variance*) , seperti yang ditampilkan pada lampiran 3 tabel 3. Hasil analisis ANOVA pada tabel 3 menunjukkan bahwa nilai dari $F_{hitung} (5,347) > F_{tabel 5\%} (2,51)$, dari hasil tersebut maka dapat dikatakan bahwa ada pengaruh

interaksi antara konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* .

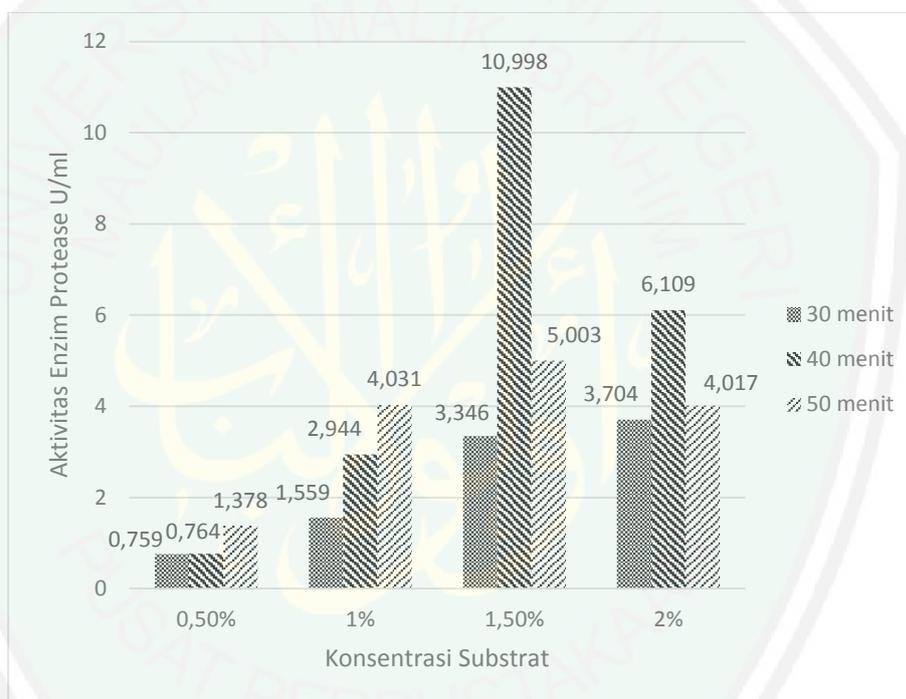
Setelah dilakukan uji ANOVA dan hasilnya berpengaruh maka dilakukan uji selanjutnya. Uji selanjutnya dilakukan untuk mengetahui perlakuan terbaik dari masing-masing perlakuan dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada tabel 4.1 . Berdasarkan hasil uji lanjut bahwa notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh nyata antara konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim protease.

Tabel 4.1 Uji DMRT Pengaruh Interaksi Suhu dan pH terhadap Aktivitas Protease

N0	Konsentrasi substrat	Lama inkubasi	Aktivitas Enzim (U/ml)	Notasi
1	0,5 %	30 menit	0,759	a
2		40 menit	0,764	a
3		50 menit	1,378	ab
4	1 %	30 menit	1,559	ab
5		40 menit	2,944	bc
6		50 menit	4,031	cd
7	1,5 %	30 menit	3,346	cd
8		40 menit	10,998	e
9		50 menit	5,003	cd
10	2%	30 menit	3,704	cd
11		40 menit	6,109	d
12		50 menit	4,010	cd

Hasil uji lanjut DMRT pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease tertinggi dari *Bacillus subtilis* yang ditumbuhkan dalam media selektif kasein pada perlakuan interaksi konsentrasi substrat 1,5 % dan lama inkubasi selama 40 menit sebesar 10,998 U/ml. Dari hasil uji DMRT diketahui hasil dari semua perlakuan berbeda nyata yang diketahui dari hasil notasi e (tabel 4.1).

Sedangkan nilai aktivitas enzim paling rendah yaitu dari interaksi konsentrasi substrat sebesar 0,5 dengan lama inkubasi 30 menit sebesar 0,759 U/ml. Hasil ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan yang lainnya yaitu interaksi lama inkubasi 30 menit dengan konsentrasi substrat (0,5%, 1% , 1,5% dan 2%) . Tidak berbeda nyata pula pada perlakuan interaksi lama inkubasi 40 menit dan konsentrasi substrat 0,5 % yakni dengan nilai aktivitas sebesar 0,764 U/ml.



Gambar 4.3 Pengaruh Interaksi Konsentrasi Substrat dan Lama Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim Protease yang di produksi oleh *Bacillus subtilis*.

Nilai dari aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis* dengan 12 perlakuan mengalami kenaikan dan penurunan. Dengan 30 menit lama inkubasi mengalami peningkatan secara berkala dan mencapai optimum pada konsentrasi substrat kasein 2% sebesar 4.017 U/ml, kemudian pada waktu inkubasi 40 menit aktivitas enzim mengalami peningkatan yang cukup

tinggi yaitu pada konsentrasi substrat kasein 1,5% sebesar 10,998 U/ml, kemudian konsentrasi substrat kasein 2% aktivitas enzim mengalami penurunan yang cukup signifikan yaitu sebesar 6,109 U/ml. Pada konsentrasi substrat kasein 1,5% dan waktu inkubasi 50 menit peningkatan aktivitasnya tidak terlalu signifikan dengan nilai sebesar 3,346 U/ml dan menurun lagi pada konsentrasi substrat kasein 2% sebesar 4,011 U/ml. Kenaikan dan penurunan enzim tersebut dapat disebabkan oleh waktu inkubasi yang terlalu lama ataupun substrat yang digunakan terlalu banyak. Fifendi (2017) menjelaskan bahwa aktivitas kerja suatu enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang tersedia, jika konsentrasi substrat yang digunakan sesuai maka dapat meningkatkan kecepatan reaksi, dan ketika jumlah konsentrasi substrat yang digunakan terlalu banyak maka dapat mengurangi kecepatan reaksi enzimatik, hal ini dikarenakan sisi aktif enzim telah jenuh.

Sugiono (2002) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa aktivitas enzim protease dengan menggunakan substrat kasein 1% dengan lama inkubasi 60 jam menghasilkan aktivitas enzim sebesar 0,239 U/ml. Lestari (2013) menjelaskan bahwa dengan menggunakan konsentrasi substrat kasein 1% menghasilkan aktivitas spesifik enzim protease tertinggi yaitu 0,738 U/ml. Menurut Walstra et al (2006) dalam Purnomo dan Purwanto (2003) bahwa kasein merupakan protein yang terdapat dalam susu. Rodarte (2011) menjelaskan bahwa kasein merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil protease khususnya bakteri *Bacillus* sp.

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang sangat berpengaruh dalam aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus*

subtilis, hal ini dikarenakan jika terlalu banyak substrat yang digunakan maka aktivitas enzim yang dihasilkan akan menurun karena enzim telah mengalami kejenuhan. Menurut Poedjiadi dan Supriyanti (2006), menjelaskan bahwa kompleks enzim dan substrat dapat diperoleh melalui adanya kontak antara enzim dengan ketersediaan substrat pada sisi aktif enzim. Jika konsentrasi substrat rendah maka aktivitas enzim yang dihasilkan juga rendah, sedangkan jika konsentrasi substrat ditingkatkan, maka hasil dari aktivitas enzim pun meningkat. Namun pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, seluruh sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat maka aktivitas enzim pun dapat menurun.

Aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* pada lama inkubasi selama 40 menit dan 50 menit mendapatkan nilai aktivitas protease yang lebih besar dibandingkan dengan aktivitas protease pada lama inkubasi 30 menit. Pada grafik (gambar 4.3) menunjukkan bahwa nilai aktivitas protease optimum yaitu pada waktu inkubasi 40 menit dengan konsentrasi substrat 1,5%. Menurut Zaidatul (2009) mengatakan bahwa waktu inkubasi optimum hidrolisis enzimatik larutan kasein oleh protease dari isolat bakteri termofilik adalah 30-40 menit dengan hasil aktivitas sebesar 0,1047 U/ml. Maziah (2009) menjelaskan bahwa kondisi optimum aktivitas katalitik protease termofilik yaitu pada waktu inkubasi selama 40 menit dengan suhu 65⁰C dengan pH 9 menghasilkan aktivitas enzim sebesar 5,25 U/ml.

Hasil penelitian oleh Soeka dan Sulistiani (2014) menyebutkan bahwa aktivitas protease *Bacillus subtilis* A1 InaCC B398 yang diisolasi dari Terasi Samarinda dalam media kasein dengan lama inkubasi 3 hari menghasilkan

aktivitas 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 dengan lama inkubasi 36 jam sebesar 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).

Peningkatan lama inkubasi pada reaksi enzim mempunyai pengaruh yang sangat besar dalam menghasilkan aktivitas enzim optimal yaitu dapat meningkatkan laju reaksi enzim. Semakin tinggi konsentrasi substrat dan semakin lama inkubasi maka aktivitas enzim yang dihasilkan semakin besar, namun pada batas tertentu aktivitas enzim tidak lagi meningkat diakrenakan enzim telah jenuh (Khasanah, 2017). Menurut Hartati (2012) mengatakan bahwa lama waktu inkubasi memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas protease isolat B2 dengan nilai tertinggi pada waktu inkubasi 60 menit yaitu sebesar 0,148 U/ml. Baehaki (2012) mengatakan bahwa protease dengan isolat A6S3 memiliki aktivitas tertinggi dengan menggunakan media LB sebesar 0,517 U/ml.

Perbedaan nilai aktivitas enzim berdasarkan lama waktu inkubasi dikarenakan jika waktu inkubasi terlalu lama membuat aktivitas enzim semakin menurun, hal ini karena enzim mengalami perubahan struktur molekul atau terdenaturasi, sehingga tidak terbentuk produk akibat aktivitas enzim mengalami

penurunan (Zusfahair, 2011). Winarno (1995) menjelaskan bahwa kecepatan hidrolisis suatu reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substratnya. Bentubo dan Gompertz (2014) menjelaskan bahwa waktu inkubasi adalah waktu yang diperlukan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat yang telah tersedia. Jika waktu inkubasi yang digunakan cukup singkat maka aktivitas enzim yang dihasilkan akan rendah dikarenakan waktu berinteraksinya sangat singkat sehingga interaksi tidak berlangsung secara keseluruhan sehingga produk yang dihasilkan sedikit.

Tingginya aktivitas protease dapat dikarenakan faktor lain selain faktor konsentrasi substrat dan lama inkubasi, melainkan bisa dikarenakan pH dan suhu seperti penelitian yang dilakukan oleh Faizah (2017) dengan menggunakan substrat limbah cair tahu dengan interaksi pH 8 dan suhu 55⁰ C menghasilkan aktivitas enzim protease sebesar 1,511 U/ml, selain dari interaksi pH dan suhu faktor lain yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim yaitu adanya penambahan ion logam sebagai aktivator enzim seperti penelitian yang dilakukan Soeka dan Sulistiani (2014) dengan menggunakan CaCl₂ dan MnCl₂ serta adanya penambahan sumber nitrogen dan sumber karbon pada perlakuan Pant, *et all* (2015). Dengan adanya kombinasi yang terjadi dilingkungan yang baik dan sesuai maka aktivitas enzim yang dihasilkan juga akan meningkat serta dapat menghidrolisis protein dalam media secara optimal.

Dengan menggunakan media yang sama yaitu media kasein hasil aktivitas enzim protease dari bakteri *Bacillus licheniformis* dengan waktu inkubasi selama 60 jam menghasilkan aktivitas sebesar 0,561 U/ml (Kandolla, 2010). Aktivitas

enzim protease dari *Bacillus* sp dengan lama waktu inkubasi selama 30 menit menghasilkan aktivitas sebesar 0,3866 U/ml (Zusfahair, 2011). Hasil kedua aktivitas protease aktivitas protease *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus* sp tersebut lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari daun kenikir yang telah di uji. Kedua bakteri tersebut sama sama menggunakan substrat kasein dengan konsentrasi 1% tetapi dengan menggunakan lama inkubasi yang berbeda, sehingga aktivitas yang dihasilkan pun berbeda. Hal ini dikarenakan bahwa setiap spesies bakteri memiliki batas toleransi tertentu terhadap lingkungan sekitar. Bakteri proteolitik yang bertoleransi terhadap lingkungan akan menghasilkan aktivitas enzim protease yang optimum.

Bacillus sp memiliki aktivitas tertinggi sebesar 146,40 U/ml pada lama inkubasi 4 hari (Utarti, 2009). Soeka (2011) *Bacillus licheniformis* menghasilkan aktivitas protease tertinggi sebesar 150,52 U/ml dengan lama inkubasi 2 hari. Sedangkan menurut Naiola (2002) *Bacillus macerans* mampu menghasilkan aktivitas tertinggi dengan waktu inkubasi 4 hari sebesar 113,52 U/ml. Sumarlin (2010) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa *Bacillus circulans* mampu menghasilkan aktivitas protease tertinggi sebesar 0,1814 U/ml dengan lama inkubasi 56 jam. Nilai aktivitas protease yang berbeda-beda menunjukkan bahwa bakteri memiliki potensi yang berbeda-beda dalam memanfaatkan nutrisi dari substrat maupun metabolismenya seperti jumlah asam amino dan enzim yang dimiliki masing-masing bakteri berbeda-beda, sehingga bakteri akan menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi dengan kondisi lingkungan yang sesuai

(Agustien, 2010). Allah berfirman dalam Q.S Al-Furqan (25) ayat 2 yang berbunyi :

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

Artinya : “ yang memiliki kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukuran dengan tepat “ (Q.S Al-Furqan: 2)

Ayat yang bergaris bawa diatas menjelaskan bahwa allah SWT telah menetapkan dari apa yang diciptakan-Nya sesuai dengan hikmah yang diinginkan-Nya dan bukan karena nafsu atau kelalaiannya, 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 manfaat dalam kehidupan bukan semata-mata kebetulan, melainkan tanda kemurahan Allah terhadap makhluk-makhlukNya. Yang demikian ini dapat dikaitkan dalam firman Allah yang berbunyi:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشًا وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرِزْقِينَ

Artinya :”Dan kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, dan (Kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-sekali bukan pemberi rizki kepadanya”

Allah SWT telah menjadikan keperluan-keperluan hidup manusia berupa buah-buahan dan biji-bijian sebagai rizki bagi makhluk-Nya (Al-Qurtubi, 2018).

Rezeki yang diberikan oleh Allah sangatlah lengkap untuk memenuhi kebutuhan makhluknya yang ada di muka bumi. Berbagai sumber kehidupan baik yang berbentuk mikro maupun makro telah oleh Allah karuniakan kepada makhluk-Nya. Seperti hal nya dengan keberadaan enzim yang dibutuhkan oleh setiap makhluk hidup untuk proses metabolisme. Misalnya enzim yang

dibutuhkan oleh manusia yaitu enzim protease. Enzim protease dihasilkan dapat dihasilkan oleh hewan, tumbuhan, dan mikroba. Enzim protease yang dihasilkan oleh mikroba merupakan salah satu bentuk rezeki yang diberikan oleh Allah untuk membantu memenuhi kebutuhan hidup manusia.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dalam penelitian kali ini yaitu:

1. Terdapat pengaruh konsentrasi substrat dengan aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari daun kenikir (*Cosmos sulphureus*) yaitu memperoleh aktivitas enzim protease tertinggi pada konsentrasi substrat 1,5 sebesar 10,998 U/ml.
2. Terdapat pengaruh lama waktu inkubasi dengan aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari daun kenikir (*Cosmos sulphureus*) yaitu memperoleh aktivitas enzim protease tertinggi pada lama waktu inkubasi sebesar 10,998 U/ml.
3. Terdapat pengaruh antara konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri endofit *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari daun kenikir (*Cosmos sulphureus*) yaitu memperoleh aktivitas enzim protease tertinggi pada perlakuan konsentrasi substrat sebanyak 1,5% dengan lama inkubasi 40 menit sebesar 10,998 U/ml , sedangkan aktivitas terendah diperoleh pada perlakuan konsentrasi substrat sebanyak 0,5% dengan lama inkubasi 30 menit sebesar 0,759 U/ml.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian lanjutan dengan menambah variabel yang diamati seperti konsentrasi enzim, penambahan aktivator dan inhibitor, serta perlu dilakukan aplikasi terhadap kehidupan sehari-hari.



DAFTAR PUSTAKA

- Agustiën, N. 2010. *Hubungan Antara Asupan Protein dengan Kekurangan Energi Kronik pada Ibu Hamil*. Surakarta: USM.
- Agustine, W. 2005. *Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan dan Produksi Xilanase Isolat AQ*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Institut pertanian bogor
- Akhdiya, Alina. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkali Termostabil. *Buletin Plasma Nutfah* 9 (2).
- Al-Qarni, Aidh. 2007. *Tafsir Al- Muyassar Jilid 2*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi jilid 7*. Jakarta : pustaka Azam.
- As-Suyuti, Al-Mahalli. 2008. *Tafsir jalalin*. Terjemah Bahrùn Abu Bakar. Bandung: penerbit Sinar Baru Algensindo.
- Aunstrup, K. 1979. Production Isolation and Economic of Ekstracelluler 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, Ace. Rinto. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Indralaya, Sumatra Selatan. *Teknologi dan Industri Pangan*. Vola XXII. No. 1.
- Bahreisy, H. 1988. *Terjemahan Singkat Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4*. Kuala Lumpur: Victory Agencie.
- Bauer MW, Halio SB & Kelly RM. 1996. Proteases and Glycosyl Hydrolases from Hyperthermophilic Microorganisms. *Adv Protein Chem*. 48: 271-310.
- Bergmeyer, H.U dan Grassal, M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis. Ed.ke-2*. Weinheim: Verlag Chemie
- Bholay, A.D. 2012. Bacterial Extraceluler Protease and its Industrial Application. *International Research Journal of Biological Science. Vol 1. No 7*
- Boyer, P. D. 1971. *The Enzymes*. 3rd ed. New York: Academic Press. Inc.
- Brock, TD., Madigan, M.T., Martinko, J.M., dan Parker, J. 2004. *Biology of Mikroorganism 7th Edition*. New Jersey: Prentice Hall
- 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. Chu 2007

- Chen, T and Ramos, J. 2010 . Enzym Kinetics (Application of uv-via spectrofotometry)
- Doi, R.H dan M. Martina. 1992. *Biology of Bacillus*. Stoneham : Butterworth Heinemann Stoneham.
- Faizah, Mamluatul, 2017. Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease *Bacillus subtilis* Dari Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) Yang Ditumbuhkan Dalam Media Campuran Limba Cair Tahu Dan Dedak. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 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.
- Ferdian, H. 2006. Potensi Protease *Bacillus subtilis nato* Sebagai Pengempuk Daging. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor : ITB.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Fifendi, Massage et all. 2017. *Mikrobiologi*. Depok. Penerbit PT Kencana
- Fitriani, E. 2003. *Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase Bacillus Pumilus Galur 55 Pada Berbagai Suhu Inkubasi*. Bogor : kimia FMIPA IPB
- 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.
- Guangrong, Huang. Ying Tiejing, Huo Po and Jiang Jiaying. 2006. Purification and Characterization of a Protease from Thermophilic Bacillus Strain HS08. *African Journal of Biotechnology*. 5 (24) : 2433-2438
- Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), pp. 15-32.
- Hames, D., dan Hooper, N. 2005. *Biochemistry*. Ed-4. New York: Taylor and Francis Group.
- Hartanti, Lilis. Yusiati Mira Lisa (2012). Karakterisasi Protease dan Isolat Bakteri Pendegradasi Tepung Bulu. *Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat Kalimantan Selatan*.
- 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.

- Indrawan, indri. 2015. Dosen Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Bakrie <https://www.bakrie.ac.id/id/berita-itp/artikel-pangan/913-enzim-pengempuk-daging> publikasi eptember 2015
- Kandolla, herlina. 2010 . Pengaruh Penambahan CaCl_2 Terhadap Produksi Enzim Protease Dari iBacillus liciniformis HSA2-1a. *Program strata Satu Jurusan kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.*
- 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.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia.* Thenawidjaja M, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari : *Principles of Biochemistry.*
- Lestari, Widya . Agustien, Anthoni dan Yetria Rilda. Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Induser Terhadap Produksi Protease Alkali *Bacillus* sp. Isolat MI.23 Termofilik. *Jurnal Biological.* Vol 2 No 1.
- Mangunwidjaja, D dan Suryani A. 1994. *Teknologi Bioproses.* Jakarta: Swadaya.
- Martin, D.W., *dkk.* 1983. Harper's Review of Biochemistry. *Large Medical Publication.* California.
- Martoharsono dan Soeharsono. 2006. Biokimia jilid I. UGM press. Yogyakarta.
- Maziah, Zaidatul (2009) Produksi dan Karakterisasi Protease Isolat Bakteri Termofilik dari Sumber Air panas Plantungan-Kendal.Tugas akhir . Universitas Negeri Semarang
- 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.
- Morgan, Jason. 2013 <https://www.craftbrewingbusiness.com/ingredients-supplies/examining-enzymes-how-brewers-use-complex-proteins/>.*Publication* March 21, 2013
- 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.

- 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.
- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzymes*. England : Ellis Horwood.
- 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.
- 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 Supriyanti, T.F.M. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI press
- Poedjiadi, A dan T, Supriyanti. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Purnomo, A.T dan D.A. Purwanto, 2003. Uji Aktivitas Crude nzim Proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah. *Majalah Farmasi Airlangga*. 3 (3) : 103-107.
- 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
- Rao, M.B, Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., dan Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:597-635
- Rodarte MP, Dias DR, Vilela DM, Schwan RS. 2011. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy Maringá*. 33(3): 457-464.
- Sadikin, M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta: Widya Medika.
- Saefudin, A. 2006. *Enzim*. Cibinong: Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI.
- Sari, W.W. 2008. Karakteristik Selulase bakteri asal tanah pertanian jawa tengah dan jawa barat. skripsi. Bogor. Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam : Institut pertanian bogor
- 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.

- Schallmeyer, M., Singh, A., dan Ward, O.P. 2004. Development in The Use of Bacillus Species for Industrial Production. *Can J. Microbiology*. Vol: 50. Hal: 1-17
- Smith, J.E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. Diterjemahkan oleh U.F. Sumo, B. Sumantri, dan Subono. Penerbit Gramedia. Jakarta
- Soeka, Yati Sudaryati., dan Sulistiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus Subtilis* A1 Inacc B398 yang Diisolasi dari Terasi Samarinda. *Berita Biologi* 13(2): 203-212.
- Sugiono, Rosita A J (2002), Penapisan dan Karakteristik Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. *Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi Manado*.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Sulastris, 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 Fe³⁺ Terhadap Aktivitas Xilanase Dari *Trichoderma viride*. *Kimia Student Journal*. 2 (2) : 470-476.
- Sulistyo. 1999. Penerapan Teknologi Enzimatik Mikroba bagi Industri Pangan, Farmasi dan Kosmetika. Prosiding Seminar Hasil-hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat, Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat IPB. Bogor, 16 September 1999
- 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.
- Susanti EVH. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Jurnal Biodiversitas* no 4 Vol 1, 12-17.
- Susanti, R. 2017. *Teknologi Enzim*. Yogyakarta. CV Andi Offset.
- Thomas, D.B. 1984. *A Textbook Of Industrial Microbiology*. USA: Sinaver Associates Sunderland.
- Utarti, E, dkk. 2009. Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus* sp 31. *Ilmu Dasar*. (10)1: -

- Volk, W.A dan Wheeler,M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markam. Jakarta : Erlangga
- Waluyo, lud. 2007. *Mikrobiologi Umum*. UPT Penerbit UMM. Malang
- Ward, O.P 1983. *Proteinase di dalam Microbial Enzyme And Biotechnology*. W.M. Fogart.Applied Science Publisher. New York.
- Ward, O.P. 1985. *Proteolitic Enzyme*. New York: Pergamon.
- Whittaker, J.R. 1994. *Principles of Enzymology for The Food Sciences*. Second Edition. New York : Marcek Dekker Inc.
- 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.
- Winarno, F.G. 1989. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia.
- Wuryanti, 2004.Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) *JKSA*. 7(3): 83-37
- Yuniati, Rani., TitaniaT. Nugroho., Fifi Puspita.2015. Uji Aktivitas Enzim Protease dari isolat Bacillus sp. Galur Lokal Riau. *Journal FMIPA*.1(12) : 116-122
- Zaidatul, atik . 2009 . Produksi dan Karakterisasi Protease Isolat Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Plantungan-Kendal. *Skripsi Jurusan kimia . Universitas Negri Semarang*
- Zusfahair, 2011. Amobilisasi Protease Dari *Bacillus* sp. BT 1 Menggunakan Poliakrilamida. *Jurnal molekul*, Vol 6 No 2.

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

1. Asam Klorida (HCL 1 mol/L)

9,8 ml HCL pekat

→ Diencerkan dengan menambahkan aquades menjadi 72 ml

→ Diaduk menggunakan stirer

Hasil

2. Asam klorida (HCl 0.05 mol/L)

1 ml HCl 1 mol/L (No 1)

→ Diencerkan dengan menambahkan 19 ml aquades

→ Diaduk menggunakan stirer

Hasil

3. Natrium hidroksida (NaOH 1 mol/L)

4 g NaOH

→ Dilarutkan dalam labu ukur hingga mencapai 100 ml

→ Dikocok

Hasil

4. Larutan tirosin standar (5 mmol/L)

45,3 mg tirosin

→ Dilarutkan dalam 50 ml aquades

→ Diaduk menggunakan stirer

Hasil

5. Larutan substrat kasein (0,5 %)

0,5 g kasein

- Dilarutkan dengan 100 ml aquades
- Ditambahkan NaOH (No 3) serta diaduk menggunakan magnet stirrer hingga semua kasein larut
- Ditambahkan 5 ml buffer borat dan ditetapkan pH nya menjadi 8 dengan penambahan HCl (No 2)

Hasil

6. Larutan substrat kasein (1%)

1 g kasein

- Dilarutkan dengan 100 ml aquades
- Ditambahkan NaOH (No 3) serta diaduk menggunakan magnet stirrer hingga semua kasein larut
- Ditambahkan 5 ml buffer borat dan ditetapkan pHnya menjadi 8 dengan penambahan HCl (No 2)

Hasil

7. Larutan substrat kasein (1,5%)

1,5 g kasein

- Dilarutkan dengan 100 ml aquades
- Ditambahkan NaOH (No 3) diaduk menggunakan magnet stirrer hingga semua kasein larut
- Ditambahkan 5 ml buffer borat dan ditetapkan pH nya menjadi 8 dengan penambahan HCl (No 2)

Hasil

8. Larutan substrat kasein (2 %)

2 g kasein

- Dilarutkan dengan 100 ml aquades
- Ditambahkan NaOH (No 3) serta diaduk menggunakan magnet stirrer hingga semua kasein larut
- Ditambahkan 5 ml buffer borat dan ditetapkan pHnya menjadi 8 dengan penambahan HCl (No 2)

Hasil

9. Asam Trikloroasetat (TCA 0.1 mol/L)

4,075 g TCA

- Dilarutkan dalam 250 ml aquades
- Diaduk hingga homogen

Hasil

10. Natrium karbonat (Na_2CO_3 0.4 mol/L)

10,599 g Na_2CO_3

- Dilarutkan dalam 250 ml aquades
- Diaduk sampai homogen

Hasil

11. Folin Ciocalteu

1 ml reagen Folin Ciocalteu

- Dilarutkan dalam 5 ml aquades
- Dihomogenkan

Hasil

12. Kalsium klorida (CaCl₂ 12 mmol/L)

66,5964 mg CaCl₂

- Dilarutkan dalam 50 ml
- Diaduk sampai homogen

Hasil

13. Kalsium klorida (CaCl₂ 2 mmol/L)

6 ml CaCl₂ 12 mmol/L (No 9)

- Dilarutkan dalam 30 ml aquades
- Diaduk hingga homogen

Hasil

14. Larutan enzim protease

1 ml ekstrak enzim protease kasar

- Ditambahkan 0,2 ml larutan CaCl₂ (No 10)
- Diaduk hingga homogen

Hasil

15. Pembuatan media NA

Pembuatan media

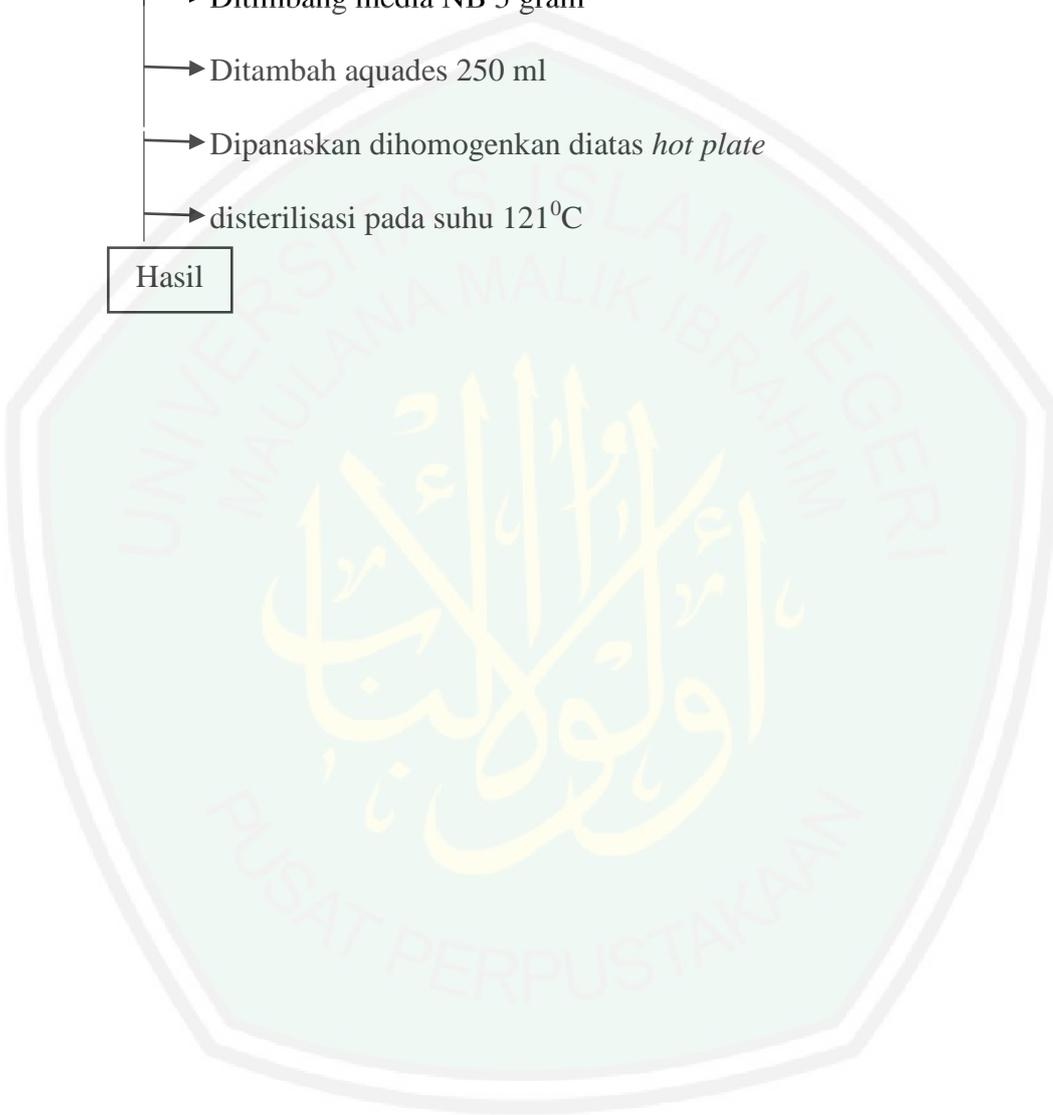
- Ditimbang media NA 10 gram
- Ditambah aquades 500 ml
- Dipanaskan dihomogenkan diatas *hot plate*
- disterilisasi pada suhu 121⁰C

Hasil

16. Pembuatan media NB

Pembuatan media

- Ditimbang media NB 5 gram
- Ditambah aquades 250 ml
- Dipanaskan dihomogenkan diatas *hot plate*
- disterilisasi pada suhu 121⁰C

Hasil

Lampiran 2 . Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

a. Absorbansi Enzim Protease sebelum Perhitungan

Tabel 1. Data Absorbansi Enzim Protease sebelum Perhitungan

Konsentrasi substrat	Lama Inkubasi	Absorbansi Sampel (Asp)			Absorbansi Standart (Ast)	Absorbansi Blanko (Abl)
		Ulangan				
		1	2	3		
0,50%	30 menit	4.117	4.799	4.794	4.224	3.665
	40 menit	4.656	4.714	4.611	4.185	3.697
	50 menit	5.112	4.739	4.789	4.217	3.684
1%	30 menit	5.417	5.319	5.364	4.792	4.293
	40 menit	6.070	5.572	5.608	4.415	3.548
	50 menit	5.749	5.846	6.179	4.447	3.649
1,50%	30 menit	6.522	6.663	6.594	5.566	4.885
	40 menit	8.371	8.174	8.169	5.901	4.916
	50 menit	6.526	6.561	6.586	5.696	5.250
2%	30 menit	6.595	6.610	6.502	5.730	5.192
	40 menit	6.311	6.461	5.841	4.343	3.391
	50 menit	5.515	5.747	5.893	4.497	3.837

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

$$PU = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times 5 \times 1/30$$

Contoh perhitungan berdasarkan rumus aktivitas enzim protease diatas :

Diketahui : P = (Pengenceran pereaksi Folin Ciocalteu sebanyak lima kali)

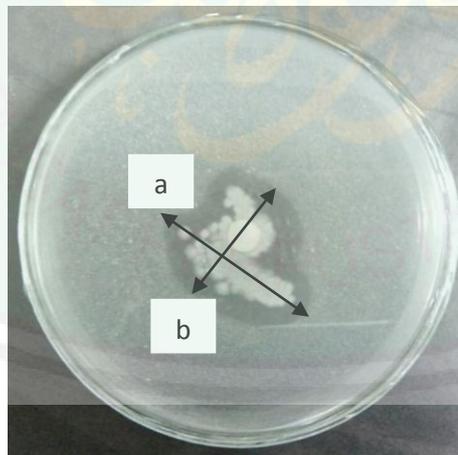
T = 30 menit (Waktu inkubasi enzim)

$$\begin{aligned} PU &= \frac{4.117 - 3.665}{4.224 - 3.665} \times 5 \times 1/30 \\ &= 0,808587 \times 5 \times 1/30 \\ &= 0,759 \end{aligned}$$

b. Aktivitas Enzim Protease setelah Perhitungan

Tabel 2. Data Aktivitas Enzim Protease Setelah Perhitungan

Konsentrasi substrat	Lama Inkubasi	Aktivitas Enzim Protease (Unit/ml)			Rata-Rata Aktivitas Enzim Protease (Unit/ml)
		Ulangan			
		1	2	3	
0,50%	30 menit	0,012	1,145	1,120	0,759
	40 menit	0,733	0,983	0,576	0,764
	50 menit	2,761	0,608	0,766	1,378
1%	30 menit	1,933	1,225	1,518	1,559
	40 menit	5,207	1,733	1,893	2,944
	50 menit	2,524	3,163	6,406	4,031
1,50%	30 menit	2,675	4,044	3,318	3,346
	40 menit	13,274	9,897	9,822	10,998
	50 menit	3,834	4,389	4,824	5,003
2%	30 menit	2,108	4,240	2,853	3,704
	40 menit	6,787	8,719	2,822	6,109
	50 menit	2,124	4,069	5,867	4,017

c. Perhitungan uji kualitatif enzim protease dengan menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA)

$$\Sigma = \frac{a+b}{2}$$

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	Sig.
Model	265,262 ^a	11	24,115	10,264	2,22	,000
Konsentrasi Substrat	147,881	3	49,294	20,983	3,01	,000
Lama Inkubasi	50,109	2	27,636	11,916	3,40	,000
KonsentrasiSubstrat * LamaInkubasi	67,272	6	11,170	4,773	2,51	,001
Error	56,381	24	2,349			
Total	321,644	36				

b. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease

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

KonsentrasiSubstrat	N	Subset			
		1	2	3	4
Duncan ^{a,b} 0,5%	9	,9949			
1%	9		2,8447		
2%	9			4,6103	
1,5%	9				6,4488
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

c. Pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas enzim protease

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

LamaInkubasi	N	Subset	
		1	2
30menit	12	2,3419	
50menit	12	3,6074	
40menit	12		5,2247
Sig.		,054	1,000

- d. Interaksi antara konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim protease

Tabel 6. Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk pengaruh interaksi antara konsentrasi substrat dan lama inkubasi terhadap aktivitas enzim protease

Interaksi	N	Subset				
		1	2	3	4	5
K1L1	3	,7590				
K1L2	3	,8473				
K1L3	3	1,3783	1,3783			
K2L1	3	1,5587	1,5587			
K2L2	3	2,9443	2,9443	2,9443		
K3L1	3	3,3457	3,3457	3,3457	3,3457	
K4L1	3	3,7043	3,7043	3,7043	3,7043	
K4L3	3		4,0173	4,0173	4,0173	
K2L3	3		4,0310	4,0310	4,0310	
K3L3	3			5,0030	5,0030	
K4L2	3				6,1093	
K3L2	3					10,9977
Sig.		,057	,085	,172	,070	1,000

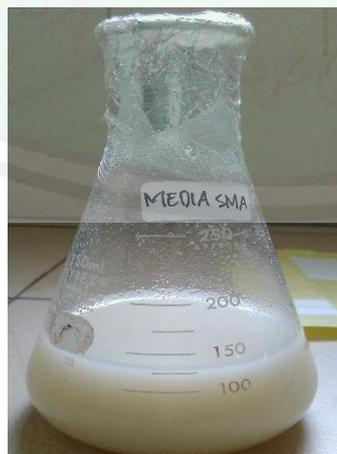
Lampiran 4 . Dokumentasi Penelitian



Gambar a. Media NB



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. Konsentrasi substrat kasein konsentrasi 0,5 , 1%, 1,5% dan 2%



Gambar f. Ezim kasar sebelum perlakuan



Gambar g. 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

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Eva Zunia Prastika
NIM : 14620020
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil TA. 2018-2019
Pembimbing : Dr.Hj. Ulfah Utami M.Si
Judul Skripsi : Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Lama Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Protease yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*

No.	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	11 januari 2018	Pengajuan Judul	1. <i>UF</i>
2.	15 januari 2018	Acc Judul	2. <i>UF</i>
3.	25 januari 2018	Konsultasi BAB 1-3	3. <i>UF</i>
4.	08 Februari 2018	Revisi BAB 1-3	4. <i>UF</i>
5.	27 Februari 2018	Revisi BAB 1-3	5. <i>UF</i>
6.	09 Maret 2018	Acc BAB 1-3	6. <i>UF</i>
7.	13 Juli 2018	Konsultasi data hasil penelitian	7. <i>UF</i>
8.	20 september	Konsultasi BAB 4	8. <i>UF</i>
9.	24 september	Revisi BAB 4	9. <i>UF</i>
10.	26 september	Revisi BAB4 dan 5	10. <i>UF</i>
11.	02 Oktober 2018	Konsultasi Keseluruhan dan ACC	11. <i>UF</i>



Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

Malang, 02 Oktober 2018
Pembimbing Skripsi

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



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

BUKTI KONSULTASI-INTEGRASI ISLAM DAN SAINS

Nama : Eva Zunia Prastika
NIM : 14620020
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil TA. 2018-2019
Pembimbing : Mujahidin Ahmad M.Sc
Judul Skripsi : Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Lama Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Protease yang Diproduksi oleh *Bacillus subtilis*
Pengaruh

No.	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	12 maret 2018	Konsultasi Integrasi Sains dan Islam BAB 1	1.
2.	13 maret 2018	Acc Integrasi Sains dan Islam BAB 1	2.
3.	14 maret 2018	Konsultasi Integrasi Sains dan Islam BAB 2	3.
4.	15 maret 2018	Acc Integrasi Sains dan Islam BAB 3-4	4.
5.	26 September	Konsultasi Integrasi Sains dan Islam BAB 4	5.
6	01 oktober 2018	Acc Keseluruhan BAB 1-4	6

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

Malang, 02 oktober 2018
Pembimbing Skripsi

Mujahidin Ahmad M.Sc
NIDT.1986 05122016 0801 1060