

**ISOLASI BAKTERI PROTEOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI
AKTIVITAS ENZIM PROTEASE PADA BERBAGAI SUHU**

SKRIPSI

Oleh:
I'ANATUL UMMAYYAH
NIM. 13630094



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**ISOLASI BAKTERI PROTEOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI
AKTIVITAS ENZIM PROTEASE PADA BERBAGAI SUHU**

SKRIPSI

Oleh:
PANATUL UMMAYYAH
NIM. 13630094

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**ISOLASI BAKTERI PROTEOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI
AKTIVITAS ENZIM PROTEASE PADA BERBAGAI SUHU**

SKRIPSI

Oleh:
PANATUL UMMAYYAH
NIM. 13630094

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 04 Desember 2019

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. Akyunul Jannah, S.Si M.P
NIP. 19750410 200501 2 009


M. Imamudin, Lc, M.A
NIP. 19740602 200901 1 010

Mengetahui,
Ketua Jurusan




Elok Kurnilah Hayati M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**ISOLASI BAKTERI PROTEOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI
AKTIVITAS ENZIM PROTEASE PADA BERBAGAI SUHU**

SKRIPSI

Oleh:
PANATUL UMMAYYAH
NIM. 13630094

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 04 Desember 2019

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(.....)
Ketua Penguji	: Anik Maunatin, S.T, M.P NIDT. 19760105 2018012 2 284	(.....)
Sekretaris Penguji	: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(.....)
Anggota Penguji	: M. Imamudin, Lc, M.A NIP. 19740602 200901 1 010	(.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kurnilah Hayati M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Panatul Ummayyah

NIM : 13630094

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

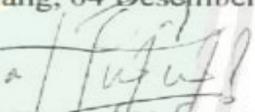
Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Proteolitik dari Beekatul dan Uji Aktivitas Enzim Protease Pada Berbagai Suhu

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

Yang membuat pernyataan
Malang, 04 Desember 2019

KEPASTERAHAN
EMPEL
DA1AHF127367742

5000
RIBU RUPIAH


Panatul Ummayyah
NIM. 13630094

MOTTO

لَا تَقْنَطُوا مِنْ رَحْمَةِ اللَّهِ ۗ
إِنَّا لِلَّهِ غُفْرَانٌ دُونَ جَمِيعًا ۗ إِنَّهُوَ الْعَفُورُ الرَّحِيمُ

**“Janganlah kamu berputus asa dari rahmat Allah.
Sesungguhnya Allah mengampuni dosa-dosa semuanya (kecuali syirik). Sungguh, Dialah Maha Pengampun, Maha Penyayang.”**



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil‘alamin, segala puji bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam, tiada sekutu bagiMu, tiada Tuhan yang pantas disembah kecuali Engkau. Dengan penuh rasa Syukur yang tiada henti penulis ucapakan dan rasakan akhirnya bisa menyelesaikan tugas akhir ini. Tanpa kehendak-Nya dan dukungan dari orang disekitar, saya tidak dapat menyelesaikan skripsi dengan cukup baik. Oleh karena itu, saya ingin mempersembahkan tulisan ini untuk:

Kedua orang tua saya, bapak A. Faizin dan ibu Sujilah, adik saya Iqbal Azmirol Ubab serta keluarga besar yang selama ini selalu memberikan segala bentuk dukungan mulai dari awal masuk kuliah hingga saya memperoleh gelar sarjana ini. Serta do’a yang tak pernah putus dipanjatkan secara ikhlas dan telah memberikan pendidikan yang tidak biasa didapatkan di bangku sekolah manapun.

Murobbi-murobbi penulis, KH. Muhammad Nashiruddin (Alm) beserta keluarga dan KH M. Chusaini Al-Hafidz beserta keluarga, atas didikan agama dan do’a yang selalu terpanjatkan untuk penulis.

Bapak dan Ibu Dosen, Khususnya Ibu Anik Ma’unatin, S.T, M.P, Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Ibu Diana Candra Dewi, M,Si dan Bapak M. Imamudin, Lc, M.A yang telah memotivasi, memberikan arahan dan membimbing dengan sangat sabar selama ini. Dari proses pembelajaran selama S-1 ini hingga akhir penelitian ini menjadikan saya bisa lebih mengerti dan memahami ilmu kimia dengan baik. Semoga kebaikan Bapak dan Ibu dosen mendapat balasan yang lebih baik dari Allah SW, Aamiin

Seluruh teman-teman kimia khususnya pujasari dan fathia yang menjadi teman seperjuangan selama penelitian. Teman satu angkatan 2013 terutama Kelas C 2013 yang memberikan banyak warna dalam proses perkuliahan. Dan juga teman-teman PPTQ Nurul Furqon khususnya kamar aisyah yang memberikan banyak warna dalam hidup penulis. Dan tak lupa Farida yang selalu bersabar atas pertanyaan tentang penyelesaian skripsi ini.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji bagi Allah Swt yang selalu melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi Bakteri Proteolitik dari Bekatul dan Uji Aktivitas Enzim Protease Pada Berbagai Suhu” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dalam bidang Kimiadi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad Saw yang telah menuntun manusia dari jalan kegelapan menuju ke jalan yang terang benderang yaitu ad-Din al-Islam.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari petunjuk dan bimbingan serta masukan dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Orang tua penulis, bapak A. Fa'izin dan Ibu Sujiah, serta adik saya Iqbal Azmirol Ubab yang telah banyak memberikan perhatian, nasihat, do'a dan dukungan baik moril maupun materil kepada penulis yang tak mungkin terbalaskan.
2. Bapak Prof. Dr. Abd. Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamila Hayati, M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

5. Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Ibu Anik Ma'unatin, S.T, M.P, Bapak Imamuddin, Lc, M.A selaku dosen pembimbing dan konsultan dalam penulisan skripsi ini.
6. Segenap dosen, laboran dan staff administrasi Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan banyak ilmu, pengetahuan, pengalaman dan wawasanya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
7. Teman-teman jurusan angkatan 2013-2015 serta semua mahasiswa Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan motivasi dan masukan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
8. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril.

Semoga Allah Swt melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. Selain itu, penulis juga berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan pembaca pada umumnya. *Aamiin*

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Malang, 4 Desember 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSUTUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
الملخص	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Bekatul	7
2.2 Protease	9
2.2.1 Klasifikasi Protease	10
2.3 Hidrolisis Protein Oleh Enzim Protease	11
2.4 Identifikasi Bakteri Secara Mikroskopis dan Makroskopis	14
2.4.1 Pewarnaan Gram	14
2.4.2 Uji Katalase	16
2.4.3 Perwarnaan Endospora	16
2.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri	18
2.6 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	19
2.7 Pengujian Aktivitas Protease	20
2.8 Identifikasi Spesies Bakteri Menggunakan <i>Microbact</i>	22
2.9 Protease dalam Industri	23
BAB III METODELOGI	25
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	25
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	25
3.2.1 Alat Penelitian	25
3.2.2 Bahan Penelitian	25

3.3 Rancangan Penelitian.....	26
3.4 Tahapan Penelitian.....	26
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	27
3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan	27
3.5.2 Pembuatan Media	27
3.5.3 Isolasi Bakteri Proteolitik dari Bekatul	28
3.5.4. Uji Bakteri Penghasil Protease Secara Kualitatif	29
3.5.5 Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis	29
3.5.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri	31
3.5.7 Produksi Enzim Protease dari Bakteri Proteolitik	32
3.5.8 Uji Aktivitas Protease Kasar	32
3.5.9 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease (Fathimah dan Wardani, 2014).	34
3.5.10 Identifikasi Secara Fenotip dengan <i>Microbact</i> 12B (Bridso, 1998)	34
3.5.11 Analisis Data	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik dari Bekatul	36
4.2 Uji Kemampuan Aktivitas Proteolitik Secara Kualitatif	37
4.3 Identifikasi Bakteri Proteolitik Secara Mikroskopis.....	40
4.3.1 Pewarnaan Gram	40
4.3.2 Uji Katalase	42
4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri	44
4.5 Produksi Enzim Protease oleh Isolat Bakteri Proteolitik	46
4.6 Uji Kemampuan Aktivitas Bakteri Proteolitik Secara Kuantitatif	47
4.6.1 Kurva Standart Tirosin	47
4.6.2 Uji Aktivitas Protease pada Berbagai Suhu	48
4.7 Identifikasi Secara Fenonip dengan <i>Microbact</i> 12B Hasil Isolat Bakteri dari Bekatul dengan aktivitas Proteolitik Tertinggi.....	54
4.8 Kajian Islam Terkait Bakteri Proteolitik Termofilik	57
BAB V PENUTUP.....	61
5.1 Kesimpulan.....	61
5.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Bentuk Koloni Bakteri Proteolitik Hasil Isolasi	37
Tabel 4.2 Hasil Kemampuan Hasil Bakteri proteolitik dari Proteolitik.....	38
Tabel 4.3 Hasil Pewarnaan Gram	40
Tabel 4.4 Hasil Uji Katalase	42
Tabel 4.5 Hasil Uji Aktivitas Protease.....	51
Tabel 4.6 Uji Biokimia menggunakan <i>Microbact</i>	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme Umum Hidrolisis Enzimatik Ikatan Peptida.....	12
Gambar 2.2 (a). Safranin (2.8-dimethyl-37-diamino-phenazine), (b). Kristal violet (hexamethyl pararosaniline).	16
Gambar 2.3 Malachite Green (4-4(dimethylimino) phenyl)	17
Gambar 2.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	19
Gambar 4.1 Kemampuan Aktivitas Proteolitik Bakteri dari Bekatul	38
Gambar 4.2 Hasil Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Proteolitik Bekatul.....	40
Gambar 4.3 Ikatan Ionik antara Kristal Violet dengan Sel Bakteri	41
Gambar 4.4 Hasil Uji Katalase Isolat Bakteri Proteolitik dari Bekatul	43
Gambar 4.5 Reaksi Degradasi H_2O_2 oleh Enzim Katalase.....	43
Gambar 4.6 Hubungan Waktu Inkubasi dengan nilai OD Bakteri.....	45
Gambar 4.7 Kurva Standar Tirosin	47
Gambar 4.8 Reaksi Hidrolisis Kasein (Ikatan Peptida) Menjadi Asam Amino....	50
Gambar 4.9 Reaksi antara Folin-Ciocalteu dengan Asam Amino	50
Gambar 4.10 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Metode Kerja	68
Lampiran 2. Pembutan Media dan Reagen	76
Lampiran 4. Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) dan Aktivitas Enzim Protease..	77
Lampiran 4. Gambar	87



ABSTRAK

Ummayyah, I. 2019. **Isolasi Bakteri Proteolitik dari Bekatul dan Uji Aktivitas Enzim Protease Pada Berbagai Suhu**. Laporan Hasil Penelitian. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (I) Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P (II) M. Imamuddin, L.c. M.A

Kata Kunci :bekatul, proteolitik, isolasi bakteri, aktivitas enzim, suhu, *microbact*

Enzim Protease dapat diproduksi oleh berbagai jenis mikroba. Pada umumnya oleh jenis bakteri dan kapang proteolitik. Bakteri proteolitik dapat diperoleh dari bekatul yang memiliki kadar protein yang cukup tinggi. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi bakteri proteolitik dari bekatul dan menguji aktivitas protease hasil isolat yang dihasilkan.

Metode penelitian ini meliputi isolasi dan seleksi bakteri proteolitik dari bekatul selanjutnya diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis sampai identifikasi spesies. Hasil isolat selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim protease pada berbagai suhu.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri proteolitik yang diisolasi dari bekatul didapatkan sebanyak tiga isolat yaitu isolat J, K, dan L. Uji makroskopis menunjukkan bahwa ke 3 isolat J berbentuk bulat kecil, elevasi tidak rata, tepian bergerigi, dan warna krem. Isolat K berbentuk bulat kecil, elevasi rata, tepian rata, dan warna krem. Sedangkan isolat L berbentuk bulat besar, elevasi cembung, tepian rata, dan warna krem. Pada uji mikroskopis yang meliputi uji katalase dan pewarnaan Gram, menunjukkan hasil yang positif dari ketiga isolat tersebut. Pada identifikasi spesies yang menggunakan *microbact* menghasilkan jenis bakteri berupa *Bacillus firmus*. Ketiga isolat tersebut didapatkan isolat terbaik dengan indeks proteolitik (IP) terbesar 7,6 yaitu isolat K. Aktivitas protease yang dihasilkan isolat K optimum pada suhu 30 °C sebesar 0,7203 Unit/mL.

ABSTRACT

Ummayyah, I. 2019. **Isolation of Proteolytic Bacteria from Rice bran and Test of Protease Enzyme Activity at Various Temperatures.** Research Report. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor: (I) Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P (II) M Imamudin, L,c. M.A

Keywords: bran, proteolytic, bacterial isolation, enzyme activity, temperature, *microbact*

Protease enzymes can be produced by various types of microbes. In general, by the type of bacteria and proteolytic mold. Proteolytic bacteria can be obtained from rice bran which has a high enough protein. The purpose of this study was to isolate proteolytic bacteria from rice bran and test the protease activity of the resulting isolates.

This research method includes isolation and selection of proteolytic bacteria from rice bran then macroscopically and microscopically identified to species identification. Results of the isolate tested protease enzyme activity was from the at various temperature.

The results of this study showed that proteolytic bacteria isolated from rice bran were obtained as many as three isolates, namely isolates J, K, and L. Macroscopic tests showed that the 3 isolates of J were small rounded, uneven elevasi, jagged edges, and cream color. K isolates are small, round elevasi, flat edges and cream colors. While the L isolates were large, convex elves, flat edges and cream colors. Microscopic tests which included catalase tests and Gram staining showed positive results from the three isolates. In the identification of species that use microbacts produced bacteria in the form of *Bacillus firmus*. The three isolates obtained the best isolates with the largest Proteolytic Index of 7.6, isolate K. The protease activity produced by the optimum K isolate at a temperature of 30 °C was 0.7203 Unit / mL.

الملخص

الأمية اعانة. ٢٠١٩. عزل البكتيريا المحللة للبروتين من نخالة الأرز وإختبار نشاط الأنزيم البروتياز في درجات حرارة المختلفة. تقرير البحث. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية، مالانج. المستشار: (I) الدكتور أكينون اللجنة الماجستير (II) محمد امام الدين الماجستير

الكلمات الرئيسية: النخالة، التحلل، العزلة البكتيرية، نشاط الإنزيم، درجة الحرارة، *microbact*

يمكن إنتاج إنزيمات البروتياز بواسطة أنواع مختلفة من الميكروبات. وبعمامة عن طريق أنواع البكتيريا والعفن المحللة للبروتين. حصل على البكتيريا المحللة للبروتين من نخالة الأرز التي تحتوي على نسبة عالية من البروتين. كان الغرض من هذا البحث هو عزل البكتيريا المحللة للبروتين عن النخالة إختبار اتششاط البروتياز المنتج.

طريقة البحث يتوى على عزل وانتقاء البكتيريا التحلل للبروتين من النخالة الأرز ثم بالتعرف شىء جلي وشىء دقيق لتعرف أنواعه. ثم فعل إختبارات نشاط إنزيمات البروتياز من العزلات في درجات حرارة المختلفة.

أظهرت نتائج هذا البحث أن البكتيريا المحللة للبروتين المعزولة من النخالة قد تم الحصول عليها حتى ثلاث عزلات، وهي العزلات J و K و L. وأظهرت الاختبارات شىء جلي أن ثلاث عزلات من المعزولة كانت مستدير صغير، بإرتفاع غير متساوية، حواف خشنة، ولونها لأصفر الشاحب. كانت K المعزولة مستدير صغير، بإرتفاع مسطح، حافة مسطحة ولونها لأصفر الشاحب. بينما كانت L المعزولة مستدير كبير، بإرتفاع محذب، حافة المسطحة ولونها لأصفر الشاحب. أظهرت الاختبارات شىء دقيق الذي يتوى على التجربة الكاتالاز و تليخ الجرام نتائج إيجابية من ثلاث عزلات. في التعرف الأنواع التي تستخدم الميكروبات تنتج البكتيريا بشكل *Bacillus firmus*. حصلت العزلات الثلاث على أفضل العزلات مع أكبر مؤشر بروتبوليتيك ٧.٦ ، وهي العزلات K. كان نشاط الأنزيم البروتيني الناتج من عزلات K المثلى عند درجة حرارة ٣٠ درجة مئوية هو ٠,٧٢٠٣ وحدة / مل.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara agraris, mampu menghasilkan 47 ton padi setiap tahun. Jumlah ini setara dengan jumlah produksi beras nasional, yakni 32 juta ton per tahunnya (Dio, 2010). Mengingat sangat pentingnya beras bagi kehidupan penduduk Indonesia menjadikan konsumsi beras per kapita meningkat tajam dari 110 kg pada tahun 1968 menjadi 146 kg pada tahun 1983 (Kuntowijoyo, 1991). Kebutuhan beras nasional terbilang cukup tinggi, sehingga hal ini berbanding lurus dengan limbah hasil samping produksi beras dari padi. Limbah dalam proses produksi beras sebagian besar berupa sekam (15-20%), dedak/bekatul (8-12%), dan menir ($\pm 5\%$) (Widiowati, 2001).

Bekatul yang merupakan salah satu hasil samping produksi beras selama ini hanya dimanfaatkan sebagai bahan pakan ternak dengan nilai jual rendah. Menurut Ardiansyah (2010) bekatul mengandung protein sebesar 14,9 %. Hal tersebut menjadi sebuah pertimbangan untuk meningkatkan pemanfaatan bekatul padi. Sehingga bekatul memiliki nilai jual yang relatif lebih tinggi.

Kandungan perotein yang cukup besar, menjadikan bekatul sebagai media yang cocok untuk pertumbuhan bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik merupakan bakteri yang menghasilkan enzim protease. Enzim protease merupakan sekelompok enzim katalitik, yang berfungsi menghidrolisis protein menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana (Watanabe dan Hayano, 1994). Keberadaan enzim merupakan salah satu bukti kebesaran Allah SWT bagi

manusia yang selalu berfikir. Allah SWT berfirman dalam surat Al-Baqarah ayat 164:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ وَالْفُلْكِ الَّتِي تَجْرِي فِي الْبَحْرِ بِمَا يَنْفَعُ النَّاسَ وَمَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنَ السَّمَاءِ مِنْ مَّاءٍ فَأَحْيَا بِهِ الْأَرْضَ بَعْدَ مَوْتِهَا وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَتَصْرِفِ الرِّيحِ وَالسَّحَابِ الْمُسَخَّرِ بَيْنَ السَّمَاءِ وَالْأَرْضِ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ



Artinya: “*Sesungguhnya dalam menciptakan 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 dia hidupan bumi sesudah mati (kering)-nya dan dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan dan pengisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi; sungguh (terdapat) tanda-tanda (keesaan dan kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan*” (QS. Al-Baqarah: 164).

Bentuk kebesaran Allah juga dijelaskan dalam Al-Qur’an surat Al-Hijr ayat 20 yang berbunyi:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ



Artinya: “*Dan kami telah menjadikan untukmu di bumi keperluan-keperluan hidup, (kami menciptakan pula) makhluk-makhluk yang kamu sekali-kali bukan pemberi rezki kepadanya*” (QS. Al-Hijr: 20)

Kedua ayat tersebut menjelaskan bahwa segala sesuatu yang telah Allah ciptakan merupakan pembuktian keberadaan Sang Pencipta. Berdasarkan ayat diatas Allah telah menyediakan segala sesuatu termasuk enzim untuk meringankan beban manusia dalam memenuhi kebutuhan hidupnya.

Enzim protease merupakan salah satu dari tiga kelompok terbesar enzim yang digunakan dalam berbagai industri. Enzim protease sangat berperan dalam bidang industri terutama dalam aplikasi bioteknologi, seperti industri pangan yaitu industri roti, industri keju, industri daging, industri bir dan industri protein dan non pangan seperti industri diterjen, industri kulit, sintesa peptida, proses penenunan dan industri farmasi. Penelitian Silaban, dkk., (2012) menunjukkan aktivitas enzim papain buah pepayadapat melunakkan daging dengan aktivitas spesifik sebesar $41,6068 \times 10^{-3}$ Unit/mg. Aktivitas ini bekerja pada pH 5,5 dan suhu 50 °C. Penelitian Pawiroharsono (2008) menyebutkan penerapan enzim protease pada proses penyamakan kulit dapat mengurangi limbah kimia seperti H₂S, amoniak, dan lemak dengan prosentase sebesar 60,1%, 8,6% dan 8,4%. Disamping itu pemanfaatan enzim dapat meningkatkan efisiensi proses penyamakan kulit, mengurangi biaya produksi dan meningkatkan kualitas kulit.

Penggunaan mikroorganisme yang digunakan untuk produksi enzim protease mempunyai beberapa kelebihan, yaitu mikroorganisme dapat hidup dan berkembangbiak dalam media limbah pertanian yang relatif lebih murah (Stanbury dan Whitaker, 1984). Keunggulan lainnya adalah mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek, serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif murah dengan jalan fermentasi (Thomas, 1984). logam karena pH optimumnya berada pada kisaran pH 7-8 (netral). Penggunaan bakteri sebagai penghasil protease dari bakteri mulai diperkenalkan sekitar tahun 1960 oleh Gebruder Schyder dan Novo. Sampai sekarang penggunaan bakteri sebagai penghasil protease mempunyai peluang yang besar untuk memproduksi protease (Elidar dan Nunuk, 2002).

Menurut Fardiaz (1979) dalam Sugiarto (2001), penggunaan kapang untuk produksi protease lebih maju daripada penggunaan bakteri. Walaupun demikian bakteri merupakan mikroorganisme yang potensial untuk produksi protease selain dari kapang. Hal ini disebabkan bakteri banyak yang termasuk dalam kelompok kemoorganotrofik sehingga mudah untuk dikembangkan dan dipelihara. Selain itu, bakteri mempunyai karakter yang beragam yakni psikotrofik, mesofilik, termofilik, alkaliofilik maupun neutrofilik. Berbagai jenis bakteri proteolitik seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, dan *Serratia* merupakan penghasil enzim protease yang cukup potensial (Suhartono, 1989). Menurut penelitian Badriyah dan Ardyati (2013) menyebutkan bakteri proteolitik dapat diisolasi dari ampas tahu yang diujikan pada substrat bekatul 2% memiliki aktivitas protease sebesar 2,24 Unit/mL pada TP5K1 dan sebesar 2,37 Unit/mL pada TP6K5. Penelitian Tiara, dkk., (2016) menyebutkan bahwa terdapat tiga isolat bakteri proteolitik yang menghasilkan aktivitas yang kuat. Berdasarkan hasil identifikasi menunjukkan bahwa ketiga bakteri tersebut adalah *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Bacillus* sp.

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah suhu. Semakin meningkatnya suhu, maka semakin meningkatnya pula aktifitas enzim. Secara umum, setiap peningkatan sebesar 10 °C di atas suhu minimum, aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Akan tetapi peningkatan suhu yang melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada penelitian Noviyanti dkk., (2002) dihasilkan pengaruh variasi temperatur terhadap aktivitas enzim protease pada daun sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels) didapatkan aktivitas enzim

tertinggi yaitu pada suhu 50 °C dengan aktivitas sebesar 1,1170 U/mL di bandingkan aktivitas enzim pada suhu 30, 40, dan 60 °C. Penelitian Herdyastuti (2006) menyebutkan suhu optimum enzim bromelin yang diisolasi dari kulit buah nanas menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu 55 °C dengan nilai aktivitas sebesar 4,05 Unit /mL, setelah melewati suhu tersebut aktivitasnya semakin menurun. Fathimah dan Wardani (2014) menunjukkan aktivitas enzim protease dari daun kelor mengalami peningkatan pada suhu 30 °C sampai suhu 60 °C, dan mengalami penurunan setelah suhu di atas 60 °C. Penurunan aktivitas enzim terjadi karena enzim mulai mengalami kerusakan gugus aktif.

Penggunaan enzim protease yang terus meningkat pada berbagai bidang industri menjadikan sumber daya alam di Indonesia sebagai peluang bagi pengembangan industri enzim. Akan tetapi kebutuhan akan enzim protease ini masih tergantung pada produksi impor. Mengingat pentingnya enzim protease dalam aplikasi dalam bidang industri, sehingga hal ini perlu dilakukan adanya penelitian eksploratif sumber enzim protease yang menghasilkan enzim protease dalam jumlah yang lebih banyak.

1.2 Rumusan Masalah

1. Jenis bakteri proteolitik apa yang mempunyai aktivitas proteolitik tertinggi hasil isolasi dari bekatul?
2. Bagaimana pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan bakteri proteolitik dari bekatul?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui jenis bakteri proteolitik yang mempunyai aktivitas proteolitik tertinggi hasil isolasi dari bekatul.
2. Untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan bakteri proteolitik dari bekatul.

1.4 Batasan Masalah

1. Isolasi bakteri proteolitik dilakukan pada sampel bekatul yang diambil dari penggilingan padi di daerah Turen Kabupaten Malang .
2. Medium yang digunakan adalah *Skim Milk Agar*.
3. Enzim proteolitik yang diisolasi merupakan ekstrak kasar enzim.
4. Variasi suhu yang digunakan adalah 30, 40, 50, dan 60 °C.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bekatul

Dalam proses penggilingan padi menjadi beras, diperoleh hasil samping berupa (1) sekam (15-20%), yaitu bagian pembungkus/kulit luar biji, (2) dedak/bekatul (8-12%) yang merupakan kulit ari, dihasilkan dari proses penyosohan, dan (3) menir ($\pm 5\%$) merupakan bagian beras yang hancur (Widiowati, 2001).

Bekatul merupakan hasil samping dari penggilingan padi/gabah yang berasal dari lapisan luar beras pecah kulit yang terdiri dari perikarp, lapisan aleuron, embrio, dan sedikit endosperm. Kandungan zat gizi yang dimiliki bekatul yaitu protein 13,11 – 17,19 %, lemak 2,52 – 5,05 %, karbohidrat 67,58 – 72,74% dan serat kasar 370,91_387,3 kalori serta kaya akan vitamin B, terutama vitamin B1 (*thiamin*) (Wulandari dan Handasari, 2010).

Adapun klasifikasi bekatul yang termasuk dalam klasifikasi padi adalah sebagai berikut (Siregar, 1981):

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae (tumbuhan)</i>
<i>Subkingdom</i>	: <i>Tracheobionta (tumbuhan berpembuluh)</i>
<i>Super divisi</i>	: <i>Spermatophyta (menghasilkan biji)</i>
<i>Divisi</i>	: <i>Magnoliophyta (tumbuhan berbunga)</i>
<i>Kelas</i>	: <i>Liliopsida (berkeping satu / monokotil)</i>
<i>Sub kelas</i>	: <i>Commelinidae</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Poales</i>
<i>Family</i>	: <i>Poaceace (suku rumput-rumputan)</i>
<i>Genus</i>	: <i>Oryza</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Oryza sativa l.</i>

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa bekatul mempunyai kandungan protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan kedelai, jagung dan terigu

(Auliana, 2011). Hal ini menunjukkan kandungan enzim yang terdapat dalam bekatul sebanding dengan kadar protein dalam bekatul. Enzim merupakan golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai biokatalisator pada reaksi-reaksi biokimia (Lehninger, 1997). Dalam bekatul terdapat enzim-enzim yang antara lain α -amilase, β -amilase, ascorbit acid oxidase, catalase, cytochrom, oxidase, dehidrogenase, deoxirebonuklease, esterase, flavin oxidase, α & β glikosidase, invertase, lecithinase, lipase, lipoxigenase, pektinase, peroxidase, phosphatase, phytase, proteinase, dan succinate dehidrogenase. (Purwanto, dkk., 2014)

Dalam firman Allah surat Al-An'am ayat 95 yang berbunyi:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَى ﴿٩٥﴾ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ذَلِكُمُ اللَّهُ فَأَلَيْ تُوْفِكُونَ



Artinya: “*sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeleluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, maka mengapa kamu masih berpaling?*” (Al-an'am [6]: 95)

Maksud dari kalimat *يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ* Hanya Allahlah yang mampu menciptakan kejadian ini. Hanya Allah yang dapat menyiapkan makhluk hidup untuk mengubah atom-atom mati menjadi sel-sel yang hidup. Hanya Allah yang mengubah sel-sel hidup sekali lagi menjadi atom-atom yang mati. Hal itu dalam siklus yang tidak ada seorangpun mengetahuinya sejak kapan dimulai dan bagaimana bisa terjadi. Sementara yang bisa disimpulkan manusia hanyalah hipotesis, teori, dan probabilitas semata (Quthb, 2002).

Al-qur'an secara tegas menyebutkan bahwa masalah menciptakan tumbuh-tumbuhan dan menghidupkan sesuatu yang mati adalah bagian dari kekuasaan Allah SWT. Kata **فَلَقُّ** (menumbuhkan) yang dimaksud dalam Al-qur'an adalah Allah menumbuhkan **الْحَبِّ** (butir tumbuh-tumbuhan) yakni dari butir padi (gabah) tumbuh menjadi tanaman padi (*oryza sativa l*). Sedangkan **الْحَبِّ** (butir tumbuh-tumbuhan) yang dimaksud dalam Al-qur'an adalah kandungan senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan yang dalam hal ini adalah kandungan senyawa kimia tumbuhan padi (*Oryza sativa l*). Bekatul merupakan kulit ari paling luar dari beras dan kulit paling dari sekam yang telah terkelupas melalui proses penggelingan dan penyosohan (Widowati, 2001).

2.2 Protease

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Enzim bekerja dengan urutan yang teratur. Enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, enzim juga mengkatalisis reaksi penyimpanan energi kimiawi dan membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana (Lehninger, 1997). Organisme hidup yang berperan sebagai sumber enzim meliputi tanaman hewan dan mikroba. Salah satu enzim yang dihasilkan mikroba adalah protease. Protease merupakan salah satu enzim yang resisten terhadap panas. Berbagai jenis bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, dan *Serratia* merupakan penghasil enzim protease yang cukup potensial (Suhartono, 1989). Protease juga dihasilkan oleh sejenis kapang, seperti

Aspergillus Oryzae, Penicillum, Aspergillus niger, dan Mucor miehei (Ramadzani, 2006).

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi biokatalis yang menyebabkan pemecahan protein. Protease menghidrolisis protein menjadi polipeptida dan asam amino. Menurut komisi tatanama *internasional union of biochemist and molecular biologist*, protease termasuk kedalam kelompok hidrolase pemecahan protein (kelompok ke III subkelompok IV). Kerja enzim ini membutuhkan air, sehingga dimasukkan dalam kelas hidrolase (Ward, 1983). Protease sering disebut enzim proteolitik karena dapat merusak protein (Janzen, dkk., 1982). Protease terdiri atas proteinase dan peptidase. Proteinase mengkatalisis reaksi hidrolisis molekul protein menjadi fragmen besar polipeptida. Peptidase menghidrolisis fragmen besar polipeptida menjadi asam amino (Winarno, 1985).

Protease dapat dihasilkan secara intraseluler dan ekstraseluler oleh hewan, tanaman, dan mikroba yang berperan penting dalam metabolisme dan regulasi sel. Protease ekstraseluler diperlukan makhluk hidup untuk menghidrolisis nutrisi protein menjadi peptide kecil dan asam amino, sehingga dapat diserap dan dimanfaatkan tubuhnya. Protease intraseluler bertanggung jawab terhadap degradasi proteolitik secara cepat dan irreversible bagi protein sel yang fungsinya tidak diperlukan lagi atau protein abnormal yang tidak bermanfaat bahkan mengganggu metabolisme sel (Suhartono, 1992).

2.2.1 Klasifikasi Protease

Secara garis besar protease dibagi menjadi dua kelompok, yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase akan memotong ikatan peptida

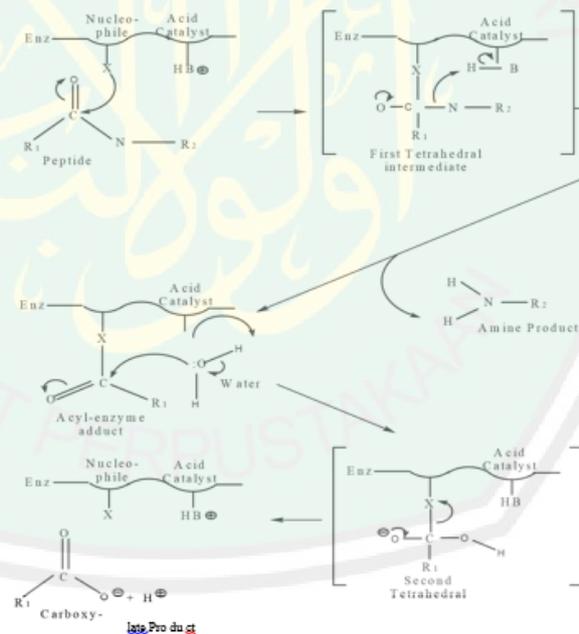
yang berada pada bagian tengah rantai polipeptida, sedangkan eksopeptidase memotong di ujung rantai polipeptida baik berupa ujung karboksil maupun ujung asam amino. Penggolongan protease lainnya adalah berdasarkan data deret asam amino enzim yang mengarah kepada hubungan evolusi dan struktur enzim. Klasifikasi ini sangat penting, mengingat kemiripan struktur enzim didalam keluarga yang sama, biasanya mencerminkan kemiripan dalam hal mekanisme katalitik (Irena, 2010). Menurut Rao, dkk., (1998) berdasarkan pH kerjanya protease asam, netral, dan alkali. Kelompok protease asam terdiri atas aspartat dan beberapa protease sistein yang memiliki pH optimum antara 2 sampai 6. Protease netral aktif pada kisaran pH netral. Dan protease alkali ditemukan aktif pada pH antara 8 sampai 13.

Ward (1983) mengklasifikasikan protease berdasarkan sifat-sifat kimia sisi aktif enzim, yaitu protease serin (memiliki asam amino serin pada sisi aktifnya), protease sulfhidril (memiliki gugus sulfhidril pada sisi aktifnya) dan protease asam (memiliki gugus karboksil pada sisi aktifnya). Menurut Sadikin (2002) berdasarkan mekanisme katalitiknya protease dapat dibagi menjadi empat yaitu protease serin, protease aspartat, dan protease logam.

2.3 Hidrolisis Protein Oleh Enzim Protease

Dalam sel eukariotik, degradasi protein terjadi dalam dua tahap. Pertama adalah protein mengalami modifikasi oksidatif untuk menghilangkan aktivitas enzimatis. Dan kedua adalah penyerangan protease yaitu enzim yang berfungsi untuk mengkatalisis degradasi protein (Toha, 2001).

Bobot molekul (BM) protein berkisar antara 5000 sampai lebih dari 1.000.000, karena itulah tergolong suatu makromolekul protein. Untuk mengetahui Komponen senyawa kimia dari makromolekul protein. Komponen senyawa kimia protein adalah peptida (sebagai sub makromolekul), asam amino (sebagai unit molekul), dan C, H, O, N, S, P, Fe, Cu, Zn, dan I (sebagai komponen unsur kimia). Hasil hidrolisis dari semua macam protein yang ada dalam alam ini selalu menghasilkan dua puluh asam amino, sedangkan di alam ini sudah ditemukan lebih dari 150 asam amino. Ternyata asam amino yang dapat membentuk molekul protein hanya dua puluh asam amino, selebihnya terdapat bebas di alam (Hawab, 2004). Reaksi hidrolisis enzimatik ikatan peptida secara umum ditunjukkan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Mekanisme Umum Hidrolisis Enzimatik Ikatan Peptida

Hidrolisis ikatan adalah reaksi penambahan-penghilangan, dimana protease bertindak sebagai nukleofil atau bereaksi dengan membentuk satu

molekul air (Bauer, dkk., 1996). Secara umum nekluofili membentuk intermediet tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air pada protease tertentu, adisi enzim-asil dapat dibentuk dan menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang diregenerasi (Moran, dkk., 1994).

Katabolisme protein makanan pertama kali berlangsung didalam lambung. Ditempat ini protesae khas (pepsin) mendegradasi protein dengan memutuskan ikatan peptida yang ada di sisi NH₂ bebas dari asam amino aromatik, hidrofobik, atau dikarboksilat. Kemudian didalam usus, protein di degradasi oleh protease khas seperti tripsin, kimotripsin, karboksiperptidase dan elastase. Hasil pemecahan ini adalah bagian-bagian kecil polipeptida. Selanjutnya senyawa ini dipecah kembali oleh aktivitas aminopeptidase menjadi asam-asam amino bebas. Produk ini kemudian melalui dinding usus halus masuk kedalam aliran darah menuju kebagian organ termasuk ke dalam sel (Toha, 2001).

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi didalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease didalam sel, tetapi tidak semua bakteri mempunyai enzim protease ekstraseluler (Fardiaz, 1992).

Protease ekstraseluler lebih dikenal dengan nama enzim proteolitik atau protease yang merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida-peptida kecil dan asam amino. Oleh karena yang dipecah adalah rantai petida, maka enzim tersebut

dinamakan juga peptidase. Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim peptidase dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase (Mubarik, dkk., 2000).

Pepsin, kimotripsin, tripsin termasuk golongan enzim protease endopeptidase. Golongan enzim ini menyerang protein dari tengah molekul dan sering juga disebut sebagai enzim proteinase karena menyerang polipeptida tinggi atau protein. Tripsin menyerang ikatan lisis dan arginin pada terminal karboksil. Pepsin bersifat kurang khas namun lebih mengutamakan serangan pada titik asam amino aromatik atau asam amino asam. Hasil degradasi golongan enzim endopeptidase ini adalah oligopeptida atau fragmen kecil protein (Toha, 2001).

Enzim karboksipeptidase dan amino peptidase merupakan golongan enzim protease eksopeptidase yang menyerang ujung dan pangkal oligopeptida atau fragmen kecil protein. Golongan enzim ini hanya membebaskan asam-asam amino pada ujung oligopeptida (Toha, 2001). Karboksipeptidase dapat melepaskan asam amino yang memiliki gugus $-COOH$ bebas pada ujung molekul protein sedangkan aminopetidase dapat melepaskan asam amino pada ujung lainnya yang memiliki gugus $-NH_2$ bebas (Poedjiadi, 1994). Degradasi golongan enzim ini menghasilkan berbagai asam amino penyusun protein (Toha, 2001).

2.4 Identifikasi Bakteri Secara Mikroskopis dan Makroskopis

2.4.1 Pewarnaan Gram

Mikroba yang terdapat dalam memiliki beberapa perbedaan dan kesamaan pada morfologi, struktur dan sifat-sifat satu dengan lainnya. Mikroba dalam hal ini adalah bakteri secara umum hamper tidak berwarna dan kontras dengan air,

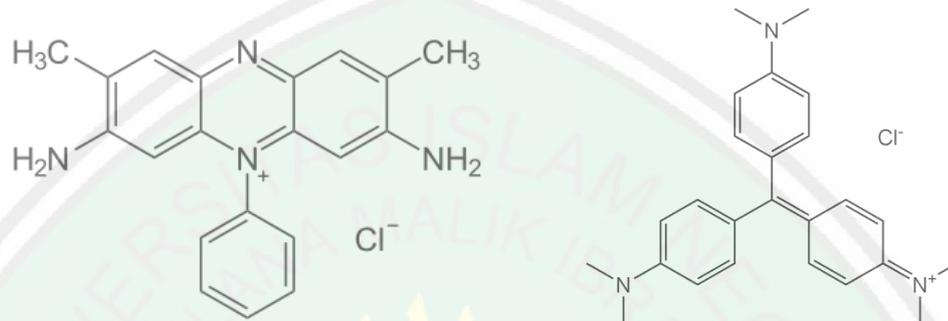
ketika tersuspensi didalamnya. Hal tersebut perlu dilakukan identifikasi bakteri salah satu metode identifikasi fisiologis adalah dengan cara pengecetan. Jawetz (2008) menyatakan bahwa metode pengetan merupakan salah satu cara paling utama dalam penelitian mikrobiologi.

Pewarnaan gram juga dapat digunakan untuk identifikasi makroskopis seperti karakterisasi koloni bakteri hasil isolasi yaitu berdasarkan (Bergey's, 2005):

1. Bentuk koloni (dilihat dari atas): brupa titik-titik, bulat berbenang, tak teratur serupa akar, serupa kumparan.
2. Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, timbul- datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
3. Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, beombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
4. Warna koloni: keputih-putihan. Kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

Prinsip dasar dari pewarnaan adalah adanya ikatan ion antara komponen selular dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Ikatan ion dapat terjadi karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna (Umsl, 2008). Kebanyakan bakteri telah bereaksi dengan pewarna-pewarna sederhana karena sitoplasmanya bersifat basofil (suka akan basa). Zat-zat warna yang digunakan untuk pewarnaan sederhana umumnya bersifat alkalin (komponen kromofornya bersifat positif). Pewarnaan sederhana ini memungkinkan dibedakannya bakteri dengan berbagai macam-macam tipe morfologi (cocus, vibrio, bacillus) dari bahan-bahan lainnya yang ada pada olesan

yang diwarnai (Hadiotomo, 1999). Zat pewarna adalah garam yang terdiri atas ion positif dan ion negatif, salah satu diantaranya berwarna. Pada zat warna yang bersifat basa, warna terdapat pada ion positif (zat pewarna⁺ Cl⁻) dan pada pewarna asam warna akan terdapat pada ion negatif (zat pewarna⁻ Na⁺) (Volk, 1993).



Gambar 2.2 (a).Safranin (2.8-dimethyl-3.7-diamino-phenazine), (b).Kristal violet (hexamethyl pararosaniline).

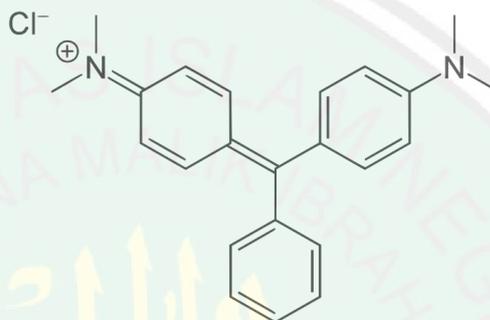
2.4.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik H₂O₂. Uji katalase dilakukan dengan menggunakan 3% H₂O₂ yang ditetaskan pada gelas objek yang berisi isolat bakteri, uji positif bila terlihat pembentukan gelembung udara (Cappucino & Sherman, 1983, Lay 1994).

2.4.3 Perwarnaan Endospora

Bakteri dibagi menjadi dua, yaitu bakteri patogen dan bakteri non patogen. Bakteri patogen merupakan bakteri penghasil racun atau yang dikenal dengan endospore. Endospora bakteri dapat diketahui dengan uji endospore bakteri

(Fardiaz, 1992). Dua bakteri yang dapat membentuk spora misalnya *Clostridium* dan *Bacillus*. *Clostridium* adalah bakteri yang bersifat anaerobik, sedangkan *Bacillus* pada umumnya bersifat aerobik. Struktur endospora mungkin bervariasi untuk setiap jenis spesies, tapi umumnya hampir sama. Endospora bakteri merupakan struktur yang tahan terhadap keadaan lingkungan yang ekstrem misalnya kering, pemanasan dan keadaan asam (Waluyo, 2005).



Gambar 2.3 Malachite Green (4,4'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenyl)

Endospora tidak mudah diwarnai dengan zat pewarna pada umumnya, tetapi sekali diwarnai, zat warna tersebut akan sulit hilang. Hal inilah yang menjadi dasar dari metode pengecetan spora secara umum. Pada metode Schaeffer-Fulton yang banyak dipakai dalam pengecetan endospora, endospora diwarnai pertama dengan malachite green dengan proses pemanasan. Larutan ini merupakan pewarna yang kuat yang dapat berpenetrasi ke dalam endospora. Setelah perlakuan malachite green, biakan sel dicuci dengan air lalu ditutup dengan cat safranin. Teknik ini akan menghasilkan warna hijau pada endospora (+) dan warna merah pada sel vegetatifnya (fardiaz, 1992).

Spesies bakteri yang termasuk dalam genera *Clostridium* dan *Bacillus* memproduksi suatu struktur di dalam selnya yang disebut endospore. Jika sel semakin tua, maka sel vegetatifnya akan pecah sehingga endospora akan terlepas

menjadi spora bebas. Berbeda dengan sel vegetatif, maka spora akan lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrim (Fardiaz, 1992).

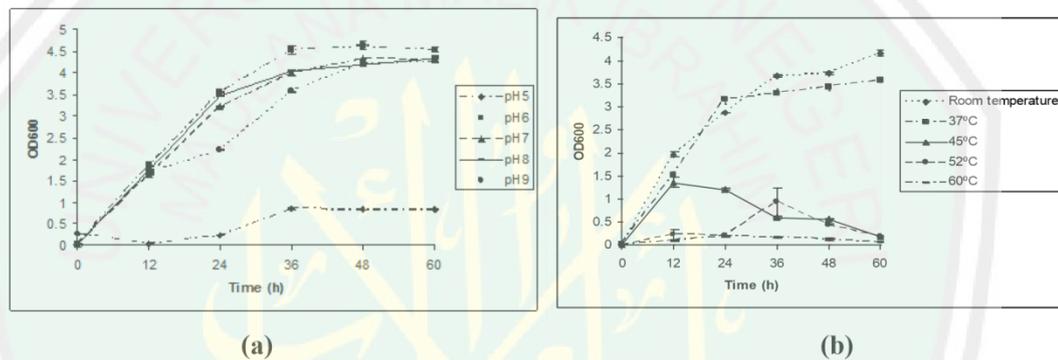
Sel bakteri yang semakin tua terjadi pada fase stasioner. Pada fase ini beberapa spesies mikroba mensintesis berbagai produk yang tampaknya tidak berperan penting dalam pertumbuhan sel, produk ini disebut metabolit sekunder. Metabolit sekunder biasa dilakukan oleh bakteri pembentuk endospora (Rahman, 1989).

2.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Empat fasa dalam kurva pertumbuhan bakteri yaitu fasa lag, log, stasioner dan kematian. Pada fasa lag, jumlah perubahan sel sangat sedikit, sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim, jadi tidak ada perubahan jumlah tetapi perubahan massa. Pada fasa log (exponensial) sel mulai membelah dan masuk ke dalam periode pertumbuhan, reproduksi sel paling aktif dan waktu generasinya konstan. Pada fase stasioner, laju pertumbuhan lambat sehingga jumlah bakteri yang hidup dan mati seimbang dan populasinya stabil. Penyebab terhentinya pertumbuhan bakteri pada fase ini adalah ketika konsentrasi sel sangat besar kekurangan nutrisi akumulasi produk limbah dan lain-lain (Tortora, dkk., 2001). Selama fase stasioner beberapa spesies mikroba mensintesis beberapa produk yang tidak berperan penting dalam pertumbuhan sel. Produksi ini disebut metabolit sekunder. Metabolit sekunder dapat bersifat sebagai antimikroba, inhibitor enzim, promoter pertumbuhan dan banyak diantaranya memiliki sifat-sifat yang berguna dibidang farmasi (Rachman, 1989). Pada fase kematian jumlah kematian akhirnya

melebihi jumlah se-sel baru terbentuk dan koloni memasuki fase kematian atau penurunan fase logaritmik (Tortora, dkk., 2001).

Pada penelitian Afrata (2015), menunjukkan bahwa pertumbuhan sel *Bacillus subtilis* strain S2-3 pada kisaran pH 5-9 yang di inkubasi pada suhu 37 °C dan diukur pada OD₆₀₀ selama 60 jam pada media kultur cair *Nutrien Broth* yang ditunjukkan pada gambar (a), sedangkan pada gambar Pertumbuhan sel *Bacillus subtilis* strain S2-3 pada kisaran pH 6 yang diinkubasi pada suhu 20-60 °C dan diukur pada pada OD₆₀₀ selama 60 jam (h) pada media kultur cair (NB).



Gambar 2.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*

2.6 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Semua enzim adalah protein dan aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Enzim seperti protein lain, mempunyai berat molekul berkisar dari kira-kira 12.000 sampai 1 juta. Oleh karena itu enzim berukuran amat besar di bandingkan dengan substrat gugus fungsional targetnya.

Pengaruh suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisa suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Sejalan dengan meningkatnya suhu, semakin meningkatnya suhu, makin

meningkat pula aktivitas enzim. Secara umum, peningkatan sebesar 10 °C di atas suhu umum, aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu yang melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada didalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan enzim didalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1997).

Suhu sangat mempengaruhi aktivitas enzim pada waktu mengkatalisis suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas terutama untuk dapat aktif. Sejalan dengan meningkatnya suhu, makin meningkat pula aktifitas enzim. Secara umum, setiap peningkatan sebesar 10 °C di atas suhu minimum, aktifitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Aktivitas enzim meningkat pada kecepatan ini hingga mencapai kondisi optimum. Peningkatan suhu yang melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada didalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein didalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktifitas enzim juga akan turun (Lehninger, 2005).

2.7 Pengujian Aktivitas Protease

Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer (1983). Prinsip pengukuran aktivitas protease dengan metode Bregmeyer agalah hidrolisis subtrat

oleh protease menjadi asam amino dan peptida. Subtrat yang digunakan adalah kasein (Suhartono, 1992). Kasein merupakan protein susu yang terdiri atas fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium kalseinat. Sepertidalam Al-qur'an surat adz-Dzariyaat [51]: 49 bahwa Allah menciptakan segala sesuatu yang ada dimuka bumi ini berpasangan. Seperti halnya Allah menciptakan laki-laki dan perempuan, siang dan malam. Begitu juga enzim diciptakan berpasangan dengan substratnya. Enzim memiliki spesifitas atau kekhasan terhadap substrat (Pelczar dan Chan, 1988). Enzim protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks dan hanya dapat mengkatalisis zat yang mengandung protein misalnya kasein dan albumin (Ward, 1983).

Laju pembentukan peptida dan asam amino tersebut dapat dijadikan tolok ukur aktivitas katalis protease. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease, dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan TCA (*Trichloro Acetic Acid*). Asam amino dan peptida akan dilarutkan dengan TCA, sedangkan protein yang memiliki bobot molekul yang besar akan mengendap. TCA juga berfungsi menginaktifkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis dibantu oleh sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk melalui tahap pemisahan tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease. Supernatan ditambahkan Na_2CO_3 0,5 M dan pereaksi folin CIOcalteau sehingga warna berubah menjadi hijau kekuningan. Larutan dibaca pada panjang gelombang 578

nm. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi asam amino yang terbentuk (Diana, 2012). Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μ mol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013).

2.8 Identifikasi Spesies Bakteri Menggunakan *Microbact*

Salah satu cara pengidentifikasian mikroorganisme yaitu dengan menganalisa kemampuan metabolismenya dengan menggunakan suatu metode uji biokimia. Uji biokimia yaitu meliputi kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan berbagai jenis sumber karbon dan senyawa kimia lainnya. Uji biokimia yang beragam dan semakin banyak jenis senyawa pengujian maka akan menghasilkan pengidentifikasian yang spesifik hingga tingkat spesies (Buckle dkk., 1987).

Kit *microbact*12E dan 12B adalah sistem identifikasi komersial untuk bakteri secara umum dan bakteri Gram negatif dengan Gram positif golongan enterobacter. *Microbact* 12E untuk Gram negatif dan 12B untuk Gram positif. Tes ini terdiri dari 12 substrat biokimia yang berbeda, tes ditempatkan disumur *microbact*. Pengujian dengan menggunakan *microbact* akan mempermudah metode pengidentifikasi suatu organisme. *Microbact* mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan reaksi yang telah distandarisasi. Pengujian dengan *microbact* memiliki beberapa ketentuan sebelum dilakukan pengujian, yaitu sampel isolat yang digunakan

merupakan isolat yang dimurnikan dan dilarutkan kedalam fisiologis (Oxoid, 2004).

Prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat kedalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang jumlahnya 12 jenis. Suspense bakteri yang dilarutkan kedalam garam fisiologis ditambahkan kemasing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia. Setelah dinkunbasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C reagen yang sesuai ditambahkan dan perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal). Nama bakteri dilihat dengan kompeter berdasarkan angka oktal yang didapat (Oxoid, 2004).

2.9 Protease dalam Industri

Dalam industri pangan protease digunakan pada pembuatan roti, biskuit, keju bir, dan alkohol. Penambahan protease pada adonan roti dimasukkan untuk mengubah elastisitas serta tekstur dari gluten, sehingga volume roti dapat ditingkatkan. Dalam pembuatan biskuit, protease digunakan untuk menghasilkan adonan dengan ekstensibilitas dan kekuatan yang seimbang, sehingga adonan dapat dibentangkan dengan tipis. Dalam industri bir, protease berfungsi sebagai penjernih. Pada industri alkohol, enzim ini digunakan untuk menghidrolisis protein yang menyelubungi pati, sehingga mudah dipecah menjadi alkohol oleh

khamir. Dalam industry pangan lainnya, protease digunakan untuk mengempukkan daging, pembuatan kecap dari kedelai, dan menghidrolisis protein pada ikan untuk menghasilkan minyak ikan (Suhartono, 1989).

Protease bakteri secara ekstensif digunakan dalam industri deterjen. Dimulai tahun 1993, protease dari ekstrak kasar protease ditambahkan pada deterjen laundry untuk mencapai hasil yang lebih baik dalam memindahkan noda proteinaceous. Berbagai enzim terutama protease, dimanfaatkan secara luas di dalam deterjen. Dari segi lingkungan penggunaan enzim didalam deterjen dipandang sangat menguntungkan, hal ini dikarenakan mengurangi keperluan senyawa fosfat. Akhir tahun 50an, protease bakteri pertama kali digunakan dalam deterjen komersil. Saat ini protease saling populer untuk digunakan dalam deterjen yang semuanya tergolong protease serin dari *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lichenformis*, *Bacillus* alkali kuat seperti *Bacillus lentus* (Rao, dkk., 1998).

BAB III

METODELOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2017 dan bertempat di Laboratorium Biotek Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kertas saring, inkubator bergoyang, lemari asam, timbangan analitik, laminar, seperangkat alat gelas, *hot plate*, oven, *autoklaf*, kawat ose, shaker, *vortex*, kawat, *spectrophotometer* UV-Vis, kertas sampul, plastik WRAP, kantong plastik tahan panas, cawan petri, mikroskop komputer, gelas objek atau preparat, bensen dan korek api.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan lain yang digunakan adalah yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel bekatul, Aquades, Alkohol 70 % untuk desinfektan, aluminium foil, Glukosa, Malachit gren, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, Na_2CO_3 , Pepton, *Skim Milk Agar (SMA)*, KH_2PO_4 kertas sampul, kertas label, tissue, kapas, H_2O_2 3%, larutan kristal ungu, larutan safranin, tirosin, buffer fosfat pH 7, asam tricloroasetat (TCA), reagen Folin.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif kualitatif yaitu melakukan isolasi dan seleksi bakteri proteolitik dari bekatul. Isolasi dilakukan dengan menggunakan media *Skim Milk Agar (SMA)* kemudian bakteri yang didapatkan dilakukan karakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis dan dilakukan uji produksi enzim protease secara kualitatif. Penelitian tahapan kedua dilakukan secara deskriptif kuantitatif untuk mengetahui pengaruh variasi suhu karakterisasi yaitu 30, 40, 50, 60 °C terhadap produksi enzim protease yang dihasilkan isolat bakteri proteolitik.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Tahap Preparasi Alat dan Bahan.
2. Pembuatan Media.
 - a. Media *Skim Milk Agar (SMA)*
 - b. Media *Spesifik Broth* (untuk pertumbuhan bakteri dan produksi enzim).
3. Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul.
4. Uji Bakteri Penghasil Protease Secara Kualitatif
5. Karakterisasi Bakteri Proteolitik.
 - a. Pewarnaan Gram.
 - b. Uji Katalase.
6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.
7. Uji Aktivitas Bakteri Proteolitik dengan Variasi suhu yaitu 30, 40, 50, 55 dan 60 °C.

8. Identifikasi bakteri isolat dengan aktivitas proteolitik tertinggi.
9. Analisis Data.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam isolasi bakteri (erlenmeyer, bluetip, tabung reaksi dan cawan petri) dicuci bersih kemudian dikeringkan. Cawan petri dibungkus dengan menggunakan kertas sampul kemudian dimasukkan kedalam kantong plastik tahan panas dan erlenmeyer juga dimasukkan kedalam kantong plastik tahan panas. Selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit.

Adapun bahan (bekatul) yang telah didapat dari penggilingan padi di Kecamatan Turen Kabupaten Malang dan disimpan ditempat yang kering untuk proses selanjutnya (isolasi bakteri).

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Skim Milk Agar (SMA) (Amelia et al, 2005)

Diitimbang 10 gram *Skim Milk Agar* (SMA) pada erlenmeyer yang sudah disterilisasi dengan spatula yang steril. Diukur aquades steril sebanyak 500 mL menggunakan labu ukur steril. Kemudian ditambahkan kedalam erlenmeyer yang telah berisi *skim milk agar* (SMA) dan dipasturisasi pada suhu 70°C selama 60 menit.

3.5.2.2 Media Spesifik Borth(Hanan, 2012)

Ditimbang 7,5 gram pepton, 5 gram glukosa, 5 gram KH_2PO_4 , dan 5 gram $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Kemudian dilarutkan kedalam 1 liter Aquades dan dipanaskan hingga larut sempurna dan di *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.3 Isolasi Bakteri Proteolitik dari Bekatul

Sebanyak 5 gram bekatul dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 45 mL NaCl 0,85% dan dikocok (pengenceran 10^{-1}), kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-10} dengan mengambil 1 mL dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 mL aquadest steril. Sebanyak 1 mL dari tiap pengenceran mulai 10^{-3} sampai 10^{-10} dimasukkan ke dalam cawan petri untuk ditumbuhkan pada media *Skim Milk Agar*(SMA)menggunakan metode *pour plate*. Kemudian diinkubas pada suhu ruang selam 72 jam (setiap hari diamati). Pengenceran dillakukan untuk menguangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga memudahkan proses isolasi.

Koloni yang dihasilkan dari isolasi diamati morfologinya dan koloni yang terpisah ditumbuhkan pada agar miring untuk pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil satu isolat bakteri dan menumbuhkan pada media *Skim Milk Agar* (SMA) dengan metode streak kuadran. Isolatmurni yang didapatkan disimpan pada media miring *Skim Milk Agar* (SMA) untuk perlakuan selanjutnya.

3.5.4. Uji Bakteri Penghasil Protease Secara Kualitatif

Koloni-koloni tunggal yang diperoleh diinokulasi kembali dalam media *Skim Milk Agar (SMA)*. Selanjutnya diinkubasi selama 24-28 jam pada suhu 53 °C. Zona bening disekitar koloni menandakan adanya aktivitas bakteri penghasil protease. Selanjutnya diukur diameternya dan ditentukan indeks Proteolitik (IP). Nilai indeks proteolitik didapatkan dengan cara membagi diameter zona bening dengan diameter zona pertumbuhan bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan luas area bening dengan luas koloni bakteri (Baehaki, 2011)

Rumus indeks proteolitik : $\frac{a}{b}$

Keterangan:

a = diameter zona bening

b = diameter koloni (Setyaningsih, 2013)

3.5.5 Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis

Identifikasi bakteri proteolitik dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi morfologi koloni, sedangkan pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan Gram, uji katalase dan endospora.

3.5.5.1 Identifikasi Makroskopis

Karakteristik koloni bakteri hasil inokulasi pada media selektif agar didasarkan pada:

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa titik-titik, bulat, berbenang, tidak teratur, serupa akar, serupa kumpara.
- b. Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, timbul-datar, melengkung, membukit serupa kawah.

- c. Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d. Warna koloni: keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan tau hamper bening.

3.5.5.2 Identifikasi Mikroskopis

3.5.5.2.1 Pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1999).

Bakteri proteolitik diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada diatas gelas objek, preparat difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan larutan kristal ungu, didiamkan selama 60 detik dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan alkohol 96 % dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop, uji Gram positif jika berwarna ungu dan uji Gram negatif jika berwarna merah.

3.5.5.2.2 Pewarnaan Endospora (Lay, 1994).

Biakan murni bakteri proteolitik diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada digelas objek, kemudian preparat difiksasi diatas api bunsen. Preparat ditetesi dengan *Malachit green*. Preparat diletakkan diatas kawat yang sudah dipanaskan

diatas air mendidih selama 10 menit. Preparat dicuci dengan hati-hati dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan menggunakan safranin, didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan hati-hati. Preparat diamati dengan mikroskop, uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau.

3.5.5.2.3 Uji Katalase (Cappucino dan Sherman, 1983, Lay 1994).

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik H_2O_2 . Uji katalase dilakukan dengan cara gelas obyek disemprot dengan etanol 70 % sampai tidak terbentuk lapisan minyak. Biakan murni bakteri yang berumur 24 jam di ambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek suspense ditetesi dengan larutan H_2O_2 3% selanjutnya diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung gas menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobiik (uji katalase tersebut positif).

3.5.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara membuat stok inokulum masing-masing isolat terpilih dengan memindahkan satu ose biakan ke dalam 50 mL medium *spesifik borth* kemudian di goyang dengan shaker pada kecepatan 125 rpm selama 24 jam. Sebanyak 20 mL, masing-masing stok tersebut dipindahkan dalam 200 mL medium serupa kemudian 3 mL dari masing-masing inokulum diambil tiap 4 jam sekali sampai pada awal fase stasioner dan diukur

absorbansinya pada panjang gelombang 747,9 nm dengan menggunakan *spectrofotometer uv-vis* sehingga didapatkan nilai OD (Optical Density). Kurva Pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu inkubasi, glukosa yang dihasilkan dan jumlah bakteri.

3.5.7 Produksi Enzim Protease dari Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri proteolitik diinokulasikan sebanyak 2 ose dalam 50 mL media pertumbuhan media *Spesifik Borth* (7,5 gram pepton, 5 gram glukosa, 5 gram KH_2PO_4 , dan 5 gram $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 50 selama 18 jam. Inokulum kemudian diambil sebanyak 5 mL dan dipindahkan dalam 50 ml media *Spesifik Broth* dan diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 50 °C selama 22 jam. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C (Apriyantono, dkk., 1989). Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim dan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

3.5.8 Uji Aktivitas Protease Kasar

3.5.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (Dina, 2012)

Panjang gelombang maksimum dicari dengan mengukur salah satu campuran standart pada panjang gelombang yang memiliki absorbansi maksimum merupakan panjang gelombang maksimum.

3.5.8.2 Pembuatan Kurva Standart Tirosin (Dina, 2012)

0,01 gram tirosin di larutkan dalam aquades menggunakan beaker gelas lalu dipindahkan ke labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

Larutan stok 100 mg/L dipipet berturut-turut 1, 3, 5, 7, dan 9 mL, masing-masing diencerkan sampai 10 mL, sehingga menghasilkan konsentrasi 10, 30, 50, 70, dan 90 mg/L. Masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian masing-masing konsentrasi tersebut ditambahkan 2,5 mL Na_2CO_3 0,5 M dan dihomogenkan. Kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen Folin Ciocalteu dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 747,9 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan linearnya.

3.5.8.3 Uji Aktivitas Protease Kasar (Elidar dan Nunuk, 2002)

Aktivitas protease diukur berdasarkan metode Bergmeyer *et al.* (1983) menggunakan substrat kasein Hammerstein 2%. Aktivitas protease diukur dengan mereaksikan 0,5 mL larutan enzim ditambahkan dengan 0,5 mL 0,05 M larutan buffer fosfat pH 7 dan diinkubasikan terlebih dahulu dalam penangas air pada suhu 30, 40, 50, dan 60 °C selama 5 menit. selanjutnya ditambahkan 0,5 mL subtrat kasein 2%. Campuran reaksi diinkubasikan kembali dalam penangas air pada suhu 30, 40, 50 dan 60 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 mL 0,4 M asam trikoloasetat (TCA). Selanjutnya larutan disentrifugasi untuk diambil supernatnya. Diambil Sebanyak 0,5 mL supernat dan ditambah dengan 2,5 ml Na_2CO_3 0,5 M, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang sudah ditambahkan dengan air dengan perbandingan (1:2) dan diinkubasi ulang selama 30 menit pada suhu ruang. Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada

panjang gelombang 747,9 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi optimum pengukuran. Hasil absorbansi dikonversikan menjadi tirosin.

Aktivitas enzim protease dihitung dengan rumus:

$$\text{Unit Aktivitas enzim} = \frac{[\text{tirosin}]}{BM} \times \frac{v}{pxq} \times fp$$

v = volume total sampel percobaan tiap tabung reaksi (ml)

p = jumlah enzim (ml)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

3.5.9 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease (Fathimah dan Wardani, 2014).

Suhu optimum yang dibutuhkan untuk reaksi enzimatik dicari dengan cara mengukur aktivitas enzim protease pada suhu yang bervariasi (30, 40, 50, dan 60). Langkah-langkah uji yang dipakai seperti pada penentuan aktivitas enzim.

3.5.10 Identifikasi Secara Fenotip dengan *Microbact* 12B (Bridso, 1998)

Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan *Microbact* sistem 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E. Kemudian satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 ml garam fisiologis 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan kedalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4

tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagent Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes. Untuk Uji fermentasi karbohidrat pada *microbact* 12B, tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil dari sumuran langsung bisa dibaca hasilnya, yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna tetap biru. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna

3.5.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini meliputi data kualitatif dan kuantitatif. Data penelitian kualitatif yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik mikroskopis dan makroskopis dari masing-masing isolat. Selanjutnya data kuantitatif data yang diperoleh yaitu aktivitas enzim protease disajikan dalam bentuk tabel kemudian diinterpretasikan sesuai data yang didapatkan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik dari Bekatul

Isolasi bakteri proteolitik dari bekatul dilakukan untuk untuk mendapatkan bakteri yang memiliki potensi untuk mendegradasi protein dengan ditandai adanya zona bening yang terbentuk. Menurut Wulan dan Handasari (2010) kandungan protein yang terkandung dalam bekatul berkisar 13,11-17,19%. Kandungan protein dalam bekatul ini memberikan informasi bahwa ada kemungkinan bakteri proteolitik mampu hidup dengan kondisi lingkungan yang kaya protein.

Isolasi bakteri proteolitik dari bekatul dilakukan dengan merendam bekatul dalam aquades dan mendiamkan selama 3 hari untuk pengayaan bakteri proteolitik. Hal ini dilakukan untuk memaksimalkan pertumbuhan bakteri. Selanjutnya dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} , pengenceran dilakukan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga memudahkan proses isolasi. Hasil pengenceran 10^{-6} sampai pengenceran 10^{-10} kemudian ditanam ke dalam media *Skim Milk Agar (SMA)* dengan metode tuang (*pour plate*) dan di inkubasi pada suhu ruang selama 3 hari, kemudian dilakukan pengamatan morfologi masing-masing isolat bakteri yang diamati yaitu meliputi karakterisasi bentuk, tepi elavasi dan warna koloni dari tiap-tiap koloni. Koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan metode *quadran streak* pada media *Nutrient Agar (NA)* dan diinkubasi kembali selama 48 jam pada suhu ruang.

Koloni murni yang diperoleh ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) miring dan dipakai sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya.

Hasil isolasi dari bekatul diperoleh 3 isolat yang mampu tumbuh pada media *Skim Milk Agar* dengan karakter morfologi koloni seperti ditunjukkan pada Tabel 4.1. Menurut Dwijoseputro (2005), pengamatan makroskopis morfologi meliputi bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni bakteri.

Tabel 4.1 Bentuk Koloni Bakteri Proteolitik Hasil Isolasi

No	Kode isolat	Morfologi Koloni			Warna
		Bentuk	Elevansi	Tepian	
1.	J	Bulat Kecil	Tidak Rata	Bergerigi	Krem
2.	K	Bulat Kecil	Rata	Rata	Krem
3.	L	Bulat Besar	Cembung	Tepi rata	Krem

4.2 Uji Kemampuan Aktivitas Proteolitik Secara Kualitatif

Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona bening disekitar koloni dengan besarnya diameter koloni (Widhiyastuti & Dewi, 2001). Isolat yang diperoleh pada tahap isolasi, diuji secara kualitatif pada media seleksi. Media seleksi yang digunakan yaitu media *Skim Milk Agar* (SMA). Menurut Widhiyastuti dan Naiola (2002) media yang digunakan untuk seleksi bakteri proteolitik mengandung susu skim dan agar. Susu merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrien. Kasein didalam media SMA terhidrolisis ditandai dengan zona bening disekitar koloni bakteri. Degradasi protein susu oleh protease menjadi asam amino menyebabkan perubahan warna putih menjadi tidak berwarna. Enzim

protease dan peptidase, berperan dalam proses hidrolisis kasein menjadi asam amino yang larut. Aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona bening tersebut. Hasil perombakan polimer protein hanya ditunjukkan dengan adanya zona jernih yang menandakan protein telah dirombak menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam medium (Irena, 2010).

Perhitungan indeks hidrolisis protein dilakukan pada masing-masing isolat bakteri dari bekatul. Kemampuan hidrolisis protein dari bakteri proteolitik ditandai dengan nilai indeks hidrolisis protein yang merupakan perbandingan antara diameter zona bening terhadap diameter koloni bakteri pada media *Skim Milk Agar* (SMA). Hasil hidrolisis dari 3 isolat terhadap protein dalam media *Skim Milk Agar* (SMA) dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Indeks Proteolitik Bakteri dari Hasil Isolasi Bekatul

Kode Isolat	Indeks Proteolitik
J	3,5
K	6,7
L	4,8



Gambar 4.1 Kemampuan Aktivitas Proteolitik Bakteri dari Bekatul

Zona bening tertinggi dihasilkan oleh isolat K, sedangkan zona bening terendah dihasilkan oleh isolat J. Semakin besar zona bening yang terbentuk disekitar koloni isolat, maka semakin besar aktivitas proteolitik yang dihasilkan. Penelitian ini menunjukkan bahwa hasil indeks proteolitik yang didapatkan pada isolat J sebesar 3,5, pada isolat K sebesar 6,7 dan pada isolat L sebesar 4,8 lebih besar dibandingkan dengan hasil penelitian Hesti, dkk (2017) yang menghasilkan indeks bakteri proteolitik yang diisolasi dari tanah Mangrove di Margomulyo, Balikpapan sebesar 2,94. Dan penelitian Andri, dkk., (2016) yang indeks proteolitiknya menghasilkan 3,02 dan 2,90 dari isolasi dan karakterisasi bakteri proteolitik dari saluran pembuangan limbah industri tahu. Menurut Ahmad dkk., (2013) Kategori Indeks Proteolitik rendah yaitu jika kurang dari 2,1, sedangkan kategori sedang yaitu apabila 2,1- 3,1, dan selebihnya dikategorikan proteolitik tinggi.

Zona bening yang terbentuk merupakan protein yang di degradasi oleh bakteri proteolitik menjadi asam amino (Shelegel, 1984), kemudian di degradasi lagi menjadi CO_2 , H_2O dan Amonia (NH_3) yang dilepaskan kelingkungan. Amonia (NH_3) diubah oleh mikroba menjadi ion ammonium (NH_4^+) yang dapat bermanfaat bagi tanaman terutama untuk pertumbuhan dan perkembangannya.

Tingginya Indeks Proteolitik pada isolat K kemungkinan disebabkan karena isolat tersebut memiliki kemampuan yang cepat dalam mensintesis dan mendegradasi asam amino (Sumardi dan Lengkana, 2009). Menurut Nadeak (2005) jumlah enzim didalam sel sangat bergantung pada kecepatan mensintesis dan mendegradasi asam amino, karena pada dasarnya dalam semua bentuk

kehidupan, enzim disintesis dari asam amino dan didegradasi menjadi asam amino.

4.3 Identifikasi Bakteri Proteolitik Secara Mikroskopis

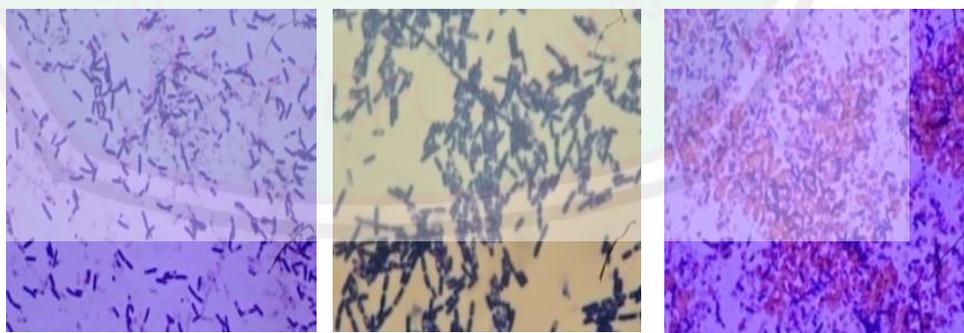
Karakterisasi bakteri proteolitik dilakukan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi morfologi koloni, sedangkan pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan Gram, uji katalase dan uji endospora.

4.3.1 Pewarnaan Gram

Pengujian pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan karakter isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Lapisan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram positif lebih tebal dibandingkan dengan bakteri Gram negatif.

Tabel 4.3 Hasil Pewarnaan Gram

Kode Isolat	Hasil	Bentuk Sel
J	+	Batang
K	+	Batang
L	+	Batang



Isolat J

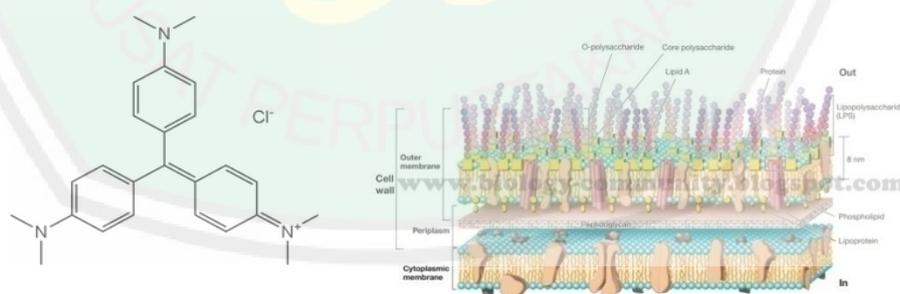
Isolat K

Isolat L

Gambar 4.2 Hasil Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Proteolitik dari Bekatul

Hasil pengujian Gram pada isolat J, K, dan L menunjukkan bakteri gram positif. Bakteri Gram positif akan dihasilkan warna ungu, dengan ketebalan dinding sel bakteri Gram positif sebesar 20-80 nm sebagian besar tersusun dari peptidoglikan yang berakibat pada banyaknya kristal violet yang diserap oleh bakteri Gram positif (Presskott dkk., 1999).

Prinsip dari perwarnaan adalah adanya ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Ikatan ion dapat terjadi karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna (Umsl, 2008). Kebanyakan bakteri telah bereaksi dengan pewarna-pewarna sederhana karena sitoplasmanya bersifat basofil (suka akan basa). Zat-zat warna yang digunakan untuk pewarnaan sederhana umumnya bersifat alkalin (komponen kromofornya bersifat positif) (Hadiotomo, 1999). Zat pewarna yang digunakan yaitu Gram yang terdiri atas ion positif dan ion negatif, salah satu diantaranya bewarna. Warna pada ion positif (zat pewarna⁺ Cl⁻) terdapat pada zat yang bersifat basa dan warna pada ion negatif (zat pewarna⁻ Na⁺) terdapat pada zat yang bersifat asam (Volk, dkk., 1988).



Gambar 4.3 Ikatan Ion antara Kristal Violet dengan Sel Bakteri (Talaro, 2005)

Bakteri Gram positif maupun Gram negatif akan dihasilkan warna yang sama (ungu). Akan tetapi banyaknya kristal violet yang diserap oleh bakteri Gram

positif lebih besar, karena tebal dinding sel bakteri Gram positif sebesar 20-80 nm yang sebagian besar tersusun dari peptidoglikan (Presscott, dkk, 1999).

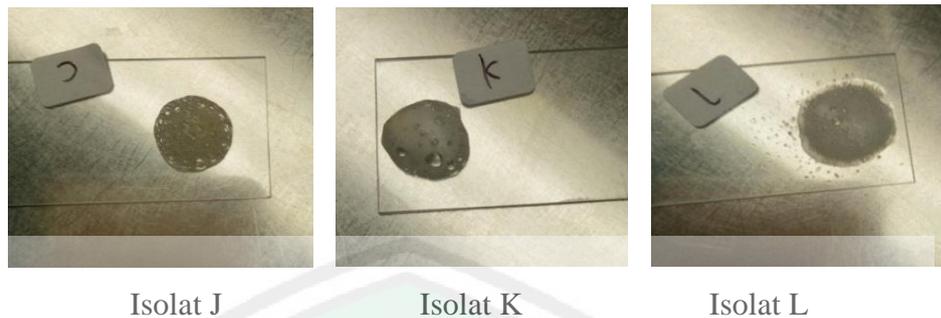
Bakteri Gram positif akan dihasilkan warna ungu, dengan tebal dinding sel bakteri Gram positif sebesar 20-80 nm sebagian besar tersusun dari peptidoglikan yang berakibat pada banyaknya kristal violet yang diserap oleh bakteri Gram positif lebih besar (Presscott, dkk., 1999). Kristal iodine yang terjebak pada polisakarida peptidoglikan (dinding sel bakteri) yang semakin menambah pekat warna ungu. ketika ditambahkan alkohol, maka hanya sedikit kristal violet dan iodine yang lepas, itu disebabkan karena tebal dinding sel bakteri Gram positif sebesar 20-80 nm, sehingga ketika ditambahkan safranin dimungkinkan safranin tersebut akan mengambil alih posisi kristal violet yang kemudian membentuk ikatan ion yang dengan dinding sel bakteri, walaupun demikian warna dari kristal iodine dan kristal violet lebih mendominasi karena tebalnya dinding sel bakteri negatif.

4.3.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik H₂O. Apabila uji katalase tersebut positif, maka akan terbentuk gelembung gas yang menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik (Lay, 1984).

Tabel 4.4 Hasil Uji Katalase

Kode Isolat	Hasil
J	+
K	+
L	+



Gambar 4.4 Hasil Uji Katalase Isolat Bakteri Proteolitik dari Bekatul

Hasil uji katalase pada semua isolat bakteri (Gambar 4.4) yang ditemukan menunjukkan hasil positif karena adanya gelembung O_2 . Pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya, menunjukkan bahwa bakteri yang diuji tersebut bersifat aerobik, sedangkan tidak adanya gelembung (negatif) menunjukkan isolat bersifat anaerobik. Dengan enzim katalase, H_2O_2 diurai dengan reaksi sebagai berikut (Ruly, 2008):



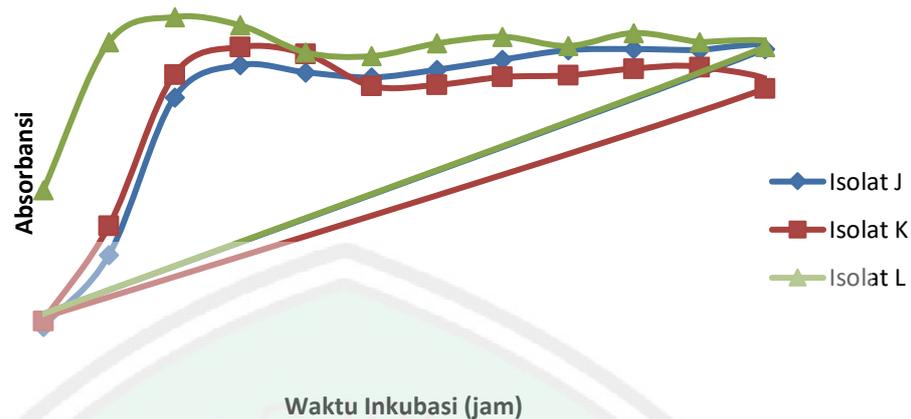
Gambar 4.5 Reaksi Degradasi H_2O_2 oleh Enzim Katalase (Pelczar, 2008).

Mikroorganisme biasanya memproduksi anion superoksida (O_2^-) dalam keadaan terdapat oksigen (O_2). Mikroorganisme aerob dapat bertahan hidup dari toksisitas anion superoksida karena memiliki enzim dismutase superoksida yang mengubahnya menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) (Volk, dkk, 1988). Uji katalase yang dilakukan pada semua isolat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi bakteri terhadap oksigen. Enzim katalase merupakan enzim yang mampu mengkatalisasi hidrogen peroksida (H_2O_2) bagi sel menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) (Volk, dkk., 1988).

4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva bakteri proteolitik menggunakan isolat bakteri yang memiliki zona bening yaitu, J, K, dan L. Kurva pertumbuhan pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi yang tepat bagi isolat J, K, dan L dalam memproduksi enzim protease kasar yang maksimal.

Kurva pertumbuhan memberikan gambaran bahwa dalam siklus kehidupan bakteri itu memiliki 4 fase, yakni fase adaptasi, fase logaritmik fase stasioner dan fase kematian (Pelczear, 2008). Berdasarkan kurva pertumbuhan dapat ditentukan waktu yang tepatoleh bakteri dalam enzim protease secara maksimal. Menurut Tortora dkk (2001), pada fase lag sel sangat sedikit, sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim. Umumnya waktu produksi enzim protease pada saat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial mendekati fase stasioner, dengan asumsi semakin banyak jumlah bakteri, maka semakin banyak pula enzim yang dihasilkan. Kemudian dikuatkan dengan kurva pertumbuhan yang dibuat dengan membuat grafik antara hubungan waktu inkubasi dengan nilai OD bakteri. Kadar protein yang dihasilkan ditandai dengan tingkat kekeruhan pada masing masing media. Alat yang di gunakan untuk pengukuran adalah spektrofotometer Uv-Vis.



Gambar 4.6 Hubungan Waktu Pertumbuhan (jam) dengan Absorbansi Sel Bakteri

Gambar 4.6 menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri proteolitik isolat J, K, dan L. Fasa logaritmik pada isolat ini (J, K, dan L) diduga terjadi setelah jam ke-4 sampai dengan sebelum jam ke-12, pada fase ini terjadi perubahan sel yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang cepat dan konstan mengikuti fase logaritmik. Kecepatan pertumbuhan pada fasa logaritmik dipengaruhi oleh medium tempat pertumbuhannya seperti pH dan kadar nutriennya, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Pada fasa ini kultur paling sensitif terhadap keadaan lingkungan. Akhir fase log, kecepatan pertumbuhan populasi menurun dikarenakan: 1) Nutrien didalam medium sudah berkurang dan 2) Adanya hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan mikroba.

Fase stasioner diduga terjadi setelah jam ke-24 hingga jam ke-48 untuk isolat J, K, dan L. Pada fase ini jumlah sel yang tumbuh sama dengan sel yang

mati sehingga keseluruhan sel tetap. Ukuran sel pada fase stasioner menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Selkemungkinan mempunyai komposisi yang berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik karena kurangnya zat nutrisi. Pada fase ini sel-sel lebih tahan tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi dan bahan-bahan kimia. Fasakematian diduga terjadi setelah jam ke-48 sampai seterusnya. Dimana pada fase ini sebagian populasi mikroba mulai mengalami kematian karena beberapa sebab yaitu: 1) Nutrien didalam medium sudah habis dan 2) Energi cadangan didalam sel habis.

4.5 Produksi Enzim Protease oleh Isolat Bakteri Proteolitik

Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan untuk hidup dan tumbuh berkembang. Medium biasa disebut substrat, medium harus mengandung nutriendan oksigen yang dibutuhkan mikroba. Media produksi untuk menghasilkan enzim harus memenuhi kebutuhan dasar untuk menghasilkan sel serta produk. Unsur utama yang paling dibutuhkan adalah nitrogen dan karbon. Nitrogen diperlukan untuk pertumbuhan sel, sedangkan karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis. Media produksi yang digunakan pada penelitian ini adalah media spesifik broth yang mengandung 7,5 gr pepton, 5 gr glukosa, 5 gr KH_2PO_4 , dan 5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

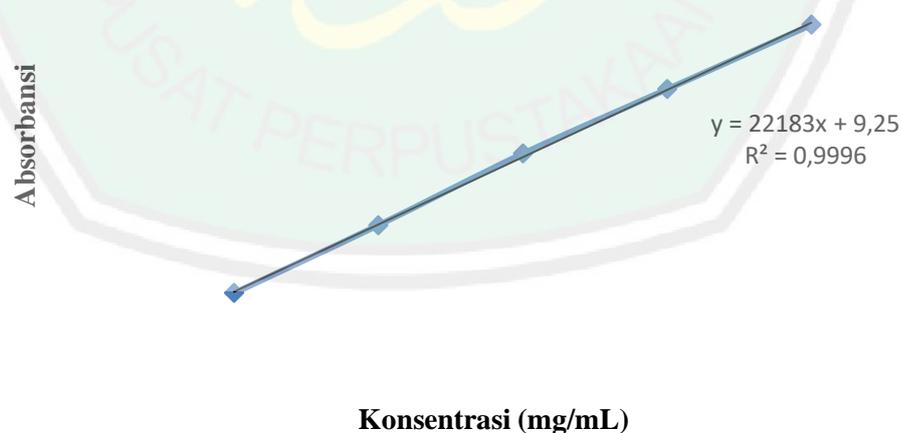
Dalam penelitian ini didapatkan waktu inkubasi optimal 48 jam. Dan pembuatan inokulum dilakukan selama waktu inkubasi 18 jam dan dalam pembuatan produksi enzim dipanen setelah waktu inkubasi 48 jam.

Hasil dari waktu kurva pertumbuhan digunakan untuk inkubasi menghasilkan enzim dengan memisahkan sel dan enzim kasar yang diperoleh dengan cara menstrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4 °C. supernatan yang diperoleh (enzim kasar) kemudian dilakukan untuk uji aktivitas enzim protease.

4.6 Uji Kemampuan Aktivitas Bakteri Proteolitik Secara Kuantitatif

4.6.1 Kurva Standart Tirosin

Kurva larutan tirosin diperoleh dengan mengukur absorbansi larutan standart tirosin, pada beberapa konsentrasi pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya yaitu sebesar 747,9 nm. Data larutan standar dan absorbansinya dapat dilihat pada tabel Lampiran 4. Setelah diperoleh absorbansi dari larutan standar, data diolah menjadi grafik antara konsentrasi larutan standar dalam satuan mg/mL dengan absorbansinya. Adapun kurva standar tirosin dapat dilihat pada grafik berikut:



Gambar 4.7 Kurva Standar Tirosin

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada hukum Lambert-Beer yang menyatakan hubungan linearitas antara absorban dengan konsentrasi larutan analit berbanding terbalik dengan transmittan (Rohman,2007). Konsentrasi larutan berbanding lurus dengan nilai serapan cahaya (absorban), menggunakan persamaan garis linear yang diperoleh dari kurva standar. Berdasarkan kurva standar antara konsentrasi dan absorbansi diperoleh persamaan garis linier $Y = 22183x + 9.25$, dan gradien linearitas sebesar $R^2 = 0,9996$. Dan dari gradien linearitas dapat diketahui bahwa kurva standart yang diperoleh kolerasi linear positif sempurna.

4.6.2 Uji Aktivitas Protease pada Berbagai Suhu

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum (Lehninger, 1993). Aktivitas enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia, yaitu dengan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut, dan secara kuantitatif ditentukan dengan mengukur laju reaksinya. Aktivitas ezim protease dihitung dalam satuan U (unit) per mili ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebanyak mL enzim yang dibutuhkan menghasilkan $1\mu\text{mol}$ tirosin tiap menit dengan substrat kasein (Yusriah dan Nengah, 2013).

Menurut fardiaz (1988) dalam memproduksi enzim dalam suatu bioproses memerlukan beberapa faktor, antara lain jenis mikroba, kurva pertumbuhan, dankondisi optimum untuk meningkatkan aktivitas enzim. Kemampuan bakteri memperbanyak sel dalam media ditunjukkan oleh kekeruhan yang terbentuk pada media. Kekeruhan terjadi karena adanya pertumbuhan bakteri dengan dengan

bertambahnya sel bakteri, memperbanyak diri dan mensekresikan enzim ke media (Sutandi, 2003).

Pada fase eksponensial sel-sel bakteri sangat aktif membelah dan metabolisme sel berlangsung cepat. ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim protease dan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim (Apriyantiono, dkk., 1989).

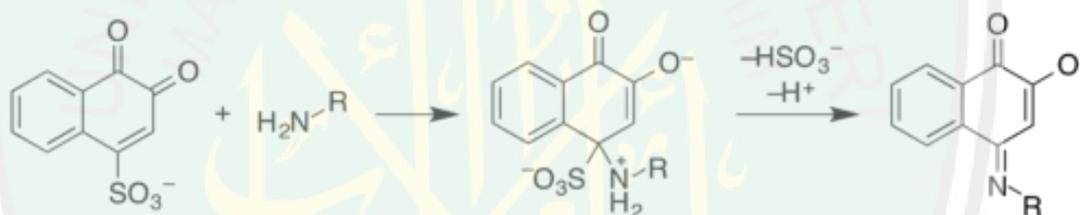
Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer (1983). Prinsip pengukuran aktivitas protease dengan metode Bergmeyer adalah hidrolisis substrat oleh protease menjadi asam amino dan peptida. Pada metode ini substrat yang digunakan adalah kasein (Suhartono, 1992). Kasein merupakan protein susu yang terdiri atas fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium kalseinat. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease, dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan asam trikloroasetat (TCA). Asam amino dan peptida akan dilarutkan dengan TCA, sedangkan protein yang memiliki bobot molekul yang besar akan mengendap. TCA juga berfungsi menginaktivkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis di bantu dengan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk melalui tahap pemisahan tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease (Irena, 2010).

Supernatan ditambahkan Na_2CO_3 0,5 M yang dapat mengikat air didalam larutan. Sebagai reagen pewarna digunakan folin Ciocelteau yang bereaksi dengan

protein dan memberikan warna biru. Prinsip metode folin-Ciocalteu adalah oksidasi gugus fenolik hidroksil. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali), mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks molybdenum-tungsen (Mo-W). Pereaksi ini digunakan untuk mengukur kadar amina dan asam amino. Pereaksi bereaksi dengan asam amino dalam larutan alkali untuk menghasilkan bahan fluoresen yang dapat dengan mudah dideteksi (Kobayashi, dkk., 1987).



Gambar 4.8 Reaksi Hidrolisis Kasein (Ikatan Peptida) Menjadi Asam Amino



Gambar 4.9 Reaksi antara Folin-Ciocalteu dengan Asam Amino (Saurina dan Hernández-Cassou, 1994)

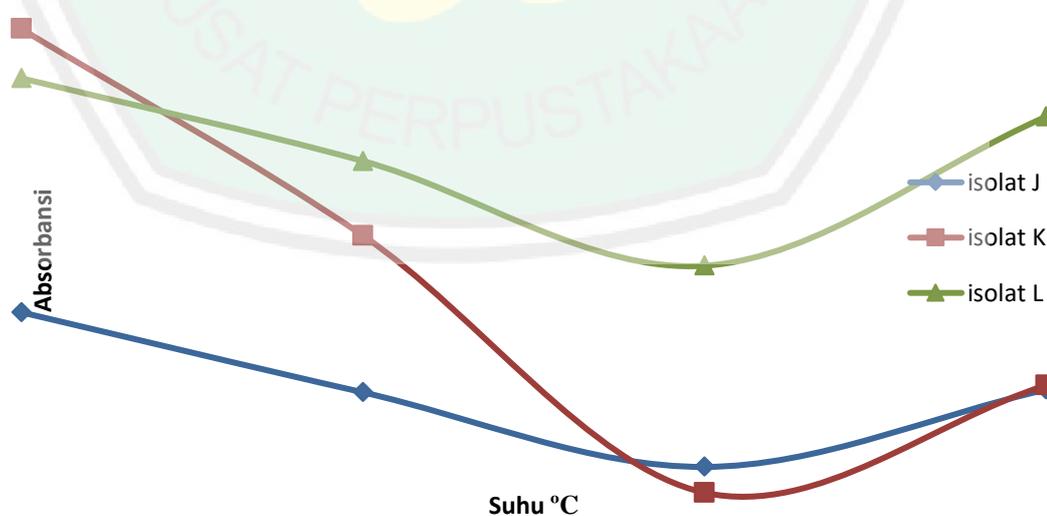
Hasil reaksi gambar (4.9) merupakan senyawa 3,4-dioxo-3,4-dihydronaphthalene-1-sulfonate yang bereaksi dengan asam amino menghasilkan zat antara dan ion sulfat dan H^+ yang membentuk senyawa 4-mono-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-olate.

Intensitas warna yang terbentuk tergantung pada jumlah asam amino aromatik yang ada didalam larutan tersebut. Hal ini didasarkan pada hukum Lambert-Beer yang menyatakan absorban berbanding lurus dengan panjang lintasan tebal kuvet, dan konsentrasi (Rohman, 2007). Larutan dibaca pada

panjang gelombang 747,9 nm dengan mencari λ maks. Hasil pengujian aktivitas protease dari tiga isolat terpilih menunjukkan aktivitas protease yang berbeda. Hasil uji aktivitas protease disajikan pada Tabel 4.5

Tabel 4.5 Hasil Uji Aktivitas Protease pada Berbagai Suhu

Kode isolat	Suhu (°C)	Rata-rata (U/mL)
J	30	0,6686
	40	0,6540
	50	0,6404
	60	0,6545
K	30	0,7203
	40	0,6826
	50	0,6357
	60	0,6553
L	30	0,7113
	40	0,6962
	50	0,6771
	60	0,7043



Gambar 4.10 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim

Tabel 4.5 menunjukkan bahwa dari ketiga isolat yang memiliki aktivitas protease termofilik pada suhu 30 °C yaitu isolat K dengan aktivitas sebesar 0,7113 U/mL, sedangkan pada suhu 40 °C aktivitas terbesar terjadi pada isolat L. Dan pada suhu 50 °C aktivitas terbesar terjadi pada isolat L, sedangkan aktivitas terbesar pada suhu 60 °C terjadi pada isolat L. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh merupakan golongan bakteri mesofil. Hal ini disebabkan karena peningkatan suhu yang melebihi suhu optimum yang terjadi pada suhu 30 °C menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Menurut Rochima (2006), meningkatnya suhu menyebabkan energi kinetik enzim semakin tinggi. Akibatnya, gerakan vibrasi, translasi dan rotasi enzim dengan substrat akan meningkat sehingga peluang keduanya bereaksi bertambah besar. Pemanasan pada suhu 40-50 °C menyebabkan protein akan terdenaturasi. Berbeda dengan penelitian Noviyanti, dkk., yang menghasilkan suhu optimum pada suhu 50 °C pada isolasi bakteri proteolitik dari daun sansakng. Dan berbeda pada penelitian Yusriah dan Nengah yang menghasilkan suhu optimum protease pada *penicilium* sp pada suhu 40 °C. Sedangkan pada penelitian Supriyatna (2015) menghasilkan aktivitas protease suhu optimum 40 °C dari larva *Hermetia ilucens* yang diberi pakan padi.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa aktivitas protease secara kuantitatif yang didapatkan lebih kecil dibandingkan dengan penelitian Badriyah dan Ardyanti (2013) menghasilkan aktivitas protease untuk isolat tertinggi yang didapatkan dari isolasi ampas tahu pada media bekatul 2% untuk isolat TP5K1 sebesar 2,24 Unit/mL, sedangkan isolat TP6K5 sebesar 2,37 Unit/mL dan pada penelitian Yunita (2012) menghasilkan aktivitas sebesar 11,60 Unit/mL pada

isolasi bakteri proteolitik dari limbah rumah pemotongan hewan. Penelitian ini menghasilkan aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan penelitian pada penelitian Andri, dkk., (2016) 2 isolat yang didapatkan dari isolasi saluran pembuangan limbah industri tahu menghasilkan nilai aktivitas yang berbeda yaitu 0,0044 U/mL untuk isolat A1 dan 0,1498 untuk isolat A4.

Hasil aktifitas enzim yang diperoleh pada penelitian ini memiliki aktifitas yang rendah dibanding dengan aktivitas protease pada isolasi bakteri proteolitik dari ampas tahu. Hal ini disebabkan enzim yang digunakan merupakan enzim ekstrak kasar yang dimungkinkan masih terdapat banyaknya pengotor pada ekstrak kasar enzim tersebut. Sehingga perlu adanya pemurnian untuk meningkatkan aktifitas enzim.

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas protease adalah suhu. Adanya peningkatan suhu akan meningkat energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Akan tetapi, peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena enzim akan mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim (Yusriah dan Nengah, 2013).

Nilai aktivitas enzim yang berbeda pada setiap isolat kemungkinan disebabkan oleh setiap jenis mikroorganisme menghasilkan enzim yang berbeda jumlah dan urutan asam amino pembentuk enzim tersebut. Suhartno (1991), menyatakan bahwa aktivitas dari enzim protease dari mikroorganisme dipengaruhi oleh jumlah enzim dan sekuen asam amino dari enzim yang dihasilkan. Menurut Agustien (2010), bahwa aktivitas spesifik enzim yang berbeda dari isolat.

4.7 Identifikasi Secara Fenonip dengan *Microbact* 12B Hasil Isolat Bakteri dari Bekatul dengan aktivitas Proteolitik Tertinggi

Tiga isolat bakteri proteolitik hasil isolasi dari bekatul perlu diidentifikasi sampai tingkat spesies untuk mengetahui jenis bakteri yang didapat. Bakteri yang terpilih merupakan isolat K yang mana isolat K ini memiliki nilai indeks proteolitik yang lebih besar dibanding dengan isolat lainnya. Hal ini dikarenakan isolat K memiliki kemampuan yang cepat dalam mensintesis dan mendegradasi asam amino (Sumardi dan Lengkana, 2009). Isolat yang mampu tumbuh pada media *Skim Milk Agar* (SMA) diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.1 Identifikasi *Bacillus firmus* menggunakan *Microbact* 12B

Identifikasi *microbact* merupakan identifikasi bakteri yang didasarkan atas kemampuan bakteri dalam memfermentasi senyawa karbohidrat dan senyawa kimia lainnya. Dalam uji ini semakin banyak senyawa pengujian maka akan menghasilkan pengidentifikasian yang spesifik hingga tingkat spesies (Buckle, dkk., 1987). *Microbact* yang digunakan yaitu *microbact* 12B untuk bakteri Gram positif. Adapun data yang diperoleh pada uji *microbact* ini ditunjukkan pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Uji Biokimia Menggunakan *Microbact*12B

Jenis Tes	Hasil Tes	Jenis Tes	Hasil Tes
Nitrat	-	Rhamnosa	-
Lysin	-	Sukrosa	-
Ornithin	-	Lactosa	-
H ₂ S	-	Arabinosa	+
Glukosa	-	Adonitol	-
Manitol	+	Raffinosa	-
Xylosa	+	Salicin	-
ONPG	+	Arginin	-
Indole	-	Hemolisa	beta
Urease	-	Uji sensitive Penicillin	-
V-P	-	Starch hydrolysis	+
Sitrat	-	Casein hydrolysis	+
TDA	-	Motilitas	-
Gelatin	+	Ornithin	-
Malonat	-	Uji sensitive Penicillin	+
Inositol	-		

Tabel 4.6 dapat dilihat bahwa isolat K yang diidentifikasi menggunakan *microbact* 12B merupakan bakteri jenis *Bacillus firmus*. Hal ini dapat dibuktikan dengan kemampuan isolat K mampu memfermentasi arabinosa, xylosa, ONPG dan mannitol. Sedangkan dalam fermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, adonitol, malonat, rhamnosa, salisin, ornithin dan arginin menunjukkan hasil yang negatif. Bakteri ini dapat tumbuh pada media nutrient broth pada suhu 20 °C hingga 45 °C.

Hasil uji *microbact* ini menunjukkan hasil bahwa isolat K merupakan bakteri yang dapat menghidrolisis kasein dan pati serta bersifat nonmotil dan sensitif terhadap penicillin. Pada uji (*Voges Proskauer*) VP hasilnya negatif, artinya bakteri ini tidak dapat memproduksi 2,3-butanediol sebagai hasil fermentasi dari glukosa (Cappucino dan Sherman, 2005). Begitu juga pada uji indol hasilnya negatif. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri ini tidak dapat mendegradasi triptopan yang merupakan asam amino esensial yang dapat mengalami oksidasi karena proses enzimatik oleh beberapa bakteri (Cappucino dan Sherman 2005). *B. firmus* tidak dapat mereduksi nitrat, nitrat merupakan

senyawa yang cukup potensial untuk menggantikan peran oksigen sebagai akseptor hidrogen final selama pembentukan energi (Cappuccino dan Sherman, 2005). Menurut Rao (2007), *Bacillus firmus* merupakan bakteri yang negatif pada uji Voges Proskaur (VP), hidrolisis kasein positif hidrolisis gelatin positif, uji katalase positif uji indol negatif, terdapat endospora, Gram positif dan bersifat nonmotil serta tidak dapat mereduksi nitrat.

Adapun ciri dari genus *Bacillus* menurut buku *Berge's Manual Determinative Bacteriology* (1994) yaitu sel berbentuk batang dan lurus, 0,5-2,5 x 1,2-10 μm , dan sering disusun berpasangan atau rantai, dengan ujung bundar atau kuadrat. Sel-sel menodai Gram positif dan mudah bergerak oleh flagela peritrichous. Endospora berbentuk oval atau terkadang bundar atau silinder dan sangat tahan terhadap banyak kondisi buruk. Tidak ada lebih dari satu spora per sel, dan sporulasi tidak diwakili oleh paparan udara. Aerobik atau anaerob fakultatif, dengan keragaman luas kemampuan fisiologis sehubungan dengan jantung, pH, salinitas. Chemoorganotrophs, dengan metabolisme fermentasi atau pernapasan, biasanya katalase positif, ditemukan di berbagai habitat, beberapa spesies bersifat patogen terhadap vertebrata atau invertebrata.

Klasifikasi bakteri *Bacillus firmus* adalah sebagai berikut:

Kingdom: Bacteria

Diviso: Firmicutes

Class: Bacilli

Ordo: Bacillales

Family: Bacillaceae

Genus: Bacillus

Spesies: Bacillus firmus

4.8 Kajian Islam Terkait Bakteri Proteolitik Termofilik

Salah satu jenis mikroorganisme yang banyak dieksplorasi adalah mikroorganisme termofilik. Pada bekatul terdapat beragam macam mikroorganisme yang sangat menarik dikaji, salah satunya adalah bakteri termofilik. Mikroorganisme tersebut merupakan kelompok bakteri yang memiliki kondisi pertumbuhan optimum pada suhu tinggi (Nam dkk., 2004).

Keberadaan mikroorganisme di bumi sebelumnya telah dijelaskan oleh Allah Subhanallahu Wa Ta'ala dalam QS. Al-Baqarah [2]: 26

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةٌ فَمَا فَوْقَهَا ﴿٢٦﴾ فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ﴿٢٦﴾ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفٰسِقِينَ ﴿٢٦﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, Maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?." dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah[34], dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik*” (QS. Al-Baqarah [2]: 26)

Al-Maraghi (1993) menjelaskan bahwa yang dimaksud dengan lebih kecil dibanding nyamuk adalah sesuatu yang tampak lebih kecil bentuknya dibanding nyamuk, misalnya mikroorganisme. Mikroorganisme tidak bisa dilihat dengan mata telanjang namun hanya bisa dilihat dengan bantuan mikroskop. Allah yang maha mengetahui lebih mengetahui hikmah yang terkandung dalam pengungkapan perumpamaan ini. Bagi orang-orang yang sudah terbiasa yang terbiasa melakukan kebaikan, mereka akan sadar dan mempunyai pandangan secara sesakma, maka ketika mendengar perumpamaan tersebut mereka justru

mendapatkan suatu petunjuk dan inspirasi. Sebab, mereka akan menghargai sesuatu sesuai dengan kemanfaatan masing-masing.

Allah SWT telah menjelaskan beberapa tanda (fenomena) di alam yang menunjukkan bukti keesaan Allah, kodratNya dan ilmuNya. Fenomena-fenomena tersebut akan dapat diambil hikmah dan manfaat bagi siapa saja yang mau berfikir. Karenanya Allah SWT tidak segan segan meninggikan derajat bagi orang-orang yang beriman dan berilmu, dalam arti memikirkan dan mentadabburi ayat-ayat Allah sebagai serana memperkuat iman dan ilmu tersebut. Allah SWT berfirman dalam surat Ali-Imran : 190-191 sebagai berikut:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَخِتَلَفِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَبْصَارِ
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ
 السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: “*sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata):*”Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka perihalahkan kami dari siksa neraka”. (Q.S. Ali-Imran : 190-191).

Hasil penelitian ini terinspirasi dari konsep “*ulul albab*” seperti yang disebutkan pada surat Ali-Imran ayat 190-191 diatas. Pada ayat tersebut, *ulul albab* diartikan sebagai orang-orang yang berakal, yang senantiasa mengingat Allah dalam kondisi apapun dan memikirkan penciptaan-Nya. Memikirkan bukan berarti hanya selalu diam berfikir, akan tetapi kita sebagai mahasiswa kimia yang dibekali dengan berbagai disiplin ilmu tentang makhluk hidup yakni biokimia dapat melakukan pengembangan dan penelitian-penelitiansejauh hal tersebut tidak

bertentangan dengan dengan syariat islam. Menurut Shihab (2002) sebagai iman *ulul albab* harus mampu mengintegrasikan semua yang telah diperoleh dalam kehidupan sehari-hari, mau befikir dan memikirkan bahwa semua yang diciptakan Allah tidaklah sia-sia. Sehingga harapan kedepan akan banyak dikembangkan penelitian-penelitian yang kompeten di bidangnya, khususnya mengenai mikrobiologi yang dikaji secara mendalam yang semua gagasan idenya bersumber dari Al-Qur'an dan As-Sunnah. Sehingga di masa depan hasil penelitian tersebut tidak diselewengkan serta dapat digunakan sebagai sarana untuk lebih mengetahui kebesarannya.

Menurut Al-Jazairi (2008) lafadz رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا maksudnya yaitu SWT menciptakan makhlukNya tanpa sia-sia tanpa adanya hikmah yang bisa yang bisa dijadikan pelajaran dan tanpa ada tujuan, tetapi Allah SWT menciptakan semua ini dengan kebenaran, untuk tujuan tujuan yang sangat luhur dan mulia. Dibalik keberadaan sesuatu yang dianggap merugikan terkandung manfaat yang mungkin manusia sering mengabaikannya. Penelitian ini dapat diketahui bahwa bakteri yang sering dianggap merugikan ternyata banyak manfaat. Bekatul yang selama ini kita jumpai merupakan limbah hasil dari pengolahan padi ternyata memiliki banyak manfaat yang terkandung di dalamnya. Salah satunya bekatul memiliki potensi untuk menghasilkan bakteri yang begitu manfaat bagi kehidupan terutama dalam industri pangan.

Dalam kitab *Al-Qawa'id al-Hisan li-Tafsir al-Qur'an* Asy-Syaikh Abdurrahman Nashir as-Sa'adi (2001) menjelaskan bahwa Allah menyerukan kepada hamba-Nya untuk memikirkan makhluk yang amat banyak ini, dan ia

memuji orang-orang yang melakukan hal itu. Allah menegaskan bahwa setiap makhluk terdapat tanda-tanda kekuasaan Allah dan pelajaran yang sangat perlu kita pahami dan ketahui demi kebaikan agama dunia kita. Karena itu seharusnya kita menelusuri jalan yang mengarah kepada tujuan ini dengan cara yang jelas dan mudah.

Singkatnya jika kita berfikir tentang alam semesta yang amat besar ini, kita akan mengetahui bahwa ia tidak mungkin ada kalau tidak ada yang menciptakannya, dan mustahil tercipta dengan sendirinya. Ini perkara yang jelas, sehingga kita yakin bahwa ia diciptakan oleh Allah yang Maha Awal, Yang tidak ada sesuatu sebelum-Nya, Yang tidak ada sesuatu pun sesudah-Nya (الأول والأخر), Yang memiliki kekuasaan sempurna, kerajaan yang maha besar, dan ilmu yang nmaha luas. Mengembalikan manusia kepada kehidupan yang kedua, setelah mati didunia adalah jauh lebih mudah bagi-Nya daripada penciptaan mereka didunia ini.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Bakteri proteolitik dengan indeks proteolitik dimiliki yang terbaik dari bekatul dimiliki isolat K. Hasil identifikasi secara kuantitatif isolat K merupakan *Bacillus firmus*
2. Aktivitas protease tertinggi pada suhu 30 °C sebesar 0,78045 U/mL. Berdasarkan uji statistik menunjukkan bahwa pengaruh suhu tidak berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas enzim.

5.2 Saran

1. Penelitian ini perlu diadakan optimasi enzim perotease (pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat) dari bakteri ini sehingga menghasilkan aktivitas enzim protease yang lebih tinggi.
2. Penelitian ini perlu dilakukan pemurnian enzim untuk meningkatkan aktivitas enzim dan pemanfaatan aplikasinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Rohman. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Agustien, N. 2010. *Hubungan Antara Asupan Protein dengan Kekurangan Energy Kronik (Kek) Pada Ibu Hamil Di Kecamatan Jebres Surakarta*. Surakarta: USM.
- Al-Jazairi, Syaikh A.B Jabir. 2008. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar Jilid 2*. Jakarta: Darus Sunnah.
- Al-Maraghi, A.Mushthafa. 1993. *Tafsir Al-Maraghi*. Semarang: Toha Putra.
- Amelia, G., Hindayani, Saskiawan, Kusniati dan Choliq. 2005. Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim Amilase dan Protease Mikroba dari Terasi Asal Kalimantan Timur. *Laporan Teknik Bidang Mikrobiologi*. Bogor: Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- Anggrawati, D. 2012. Aktivitas Enzim Selulose Isolat SGS2609bbp4b-kp Menggunkan Subtrat limbah pengolahan Rumput Laut yang dipre-Treatmen dengan Asam. *Skripsi*. Jakarta. Universitas Indonesia.
- Apriyanto, A., Fardiaz, D., Puspitasari, N. L., Sedamawati, dan Budiyanto, S. 1983. *Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan*. Bogor: IPB press.
- Ardiansyah. 2010. Bekatul Sumber Prebiotik (Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University-Senday, Jepang dan Departemen Gizi Masyarakat, FEMA-IPB). www.bekatul.net. diakses pada tanggal 27 September 2017.
- Auliana, Rizqie. 2011. Manfaat bekatul dan Kandungan Gizinya. Artikel. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Badriya, B. I. dan Ardiyanti, T. 2013. Deteksi Aktivitas Proteolitik Isolat Asal Ampas Tahu pada Subtrat Bekatul. *Jurnal Biotropika*. Vol. 1 No 3.
- Baehaki, S. E, dan I Made Jana Mejaya. 2011. Bahayanya Hama Wereng Coklat sebagai Hama Global, Strategis dan Bernilai Ekonomi Tinggi. Mkalah Seminar Nasional Wereng Coklat. Insitut Pertanian Bogor.
- Bauer MW, Halio SB & Kelly RM. 1996. *Protease and Glycosyl Hydrolases from Hyperthermophilic Microorganism*. Adv Protein Chem. 48: 271-310.
- Bergmeyer H. U dan M. M. Grassal. 1983. Method of enzymatic analysis. Edisi ke 2. Weinheim: Verlag Chemie.

- Bridson, E.Y, 1998. *The Oxoid Manual* 8th Edition. England. Oxolid Limited Hampsire.
- Buckle, K.A. 1987. *Ilmu Pangan*. Jakarta Universitas Indonesia Press.
- Cappuccino JG dan Sherman N. 1983. *Microbiology A Laboratory Manual*. New York: state University of New York.
- Chang, Chin-I., Wen-Yu Liu & Chung-Zen Shyu. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *penaeus monodon*. *Dis Aquat Org*. 43: 153-157
- Clous, D. dan D. Fritze 1989, *Bacillus* Enzym Product, *in* : *Bacillus* (HARWOOD, C. R., ed.), Plenum Pub-lishing Corp., New York : p 5 - 26.
- Clous, D. dan R.C.W. Berkeley 1986. Genus *Bacillus*, *In* : *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2 (SNEATH, P.H.A., ed.), Williams and Wilkins, Baltimore : 1105 - 1139.
- Dina Wahyun, Anthoni Agustien dan Periadnadi. 2012. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Termo-Proteolitik Sumber Air Panas Sungai Medang, Sungai Penuh Jambi. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*1 (2)- Desember 2012 : 93-98
- Dio. 2010. *Bekatul Padi Turunkan Kadar Kolesterol*. Majalah Sinar Harapan.
- Dwidjiseputro, 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Malang: Djambatan.
- Fardiaz, S.1988. *Fisiologi Fermentasi*. Jakarta: Gramedia.
- Fardiaz, S.1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia.
- Fathimah, Azmy N dan Wardani Agustin K. 2014. Ekstraksi Dan Karakterisasi Enzim Protease Dari Daun Kelor (*Moringa Oliefera* Lamk.). *Jurnal Teknologi Pangan* Vol. 15 No. 3.
- Hadioetomo, R. S. 1999. *Mikrobiologi dasar dalam Praktik*. Jakarta: PT Gramedia.
- Handayani D., Mubarik , NR., dan ListiyawatiS. 2002. Isolasi dan Karakterisasi A
- Herdyastuti, N. 2006. Isolasi dan Karakterisasi Kasar Enzim Bromelin dari Batang Nanas (*Ananas comsus L.merr*). *berk. Penel. Hayati*: 12 (75-77).
- Hawab, H. M. 2004. *Pengantar Biokimia*. Malang: Bayumedia publishing.
- Indriyanto I. 1995. Pengaruh Suhu dan Waktu Inkubasi Terhadap Produksi Enzim

- Irena, Amelinda. 2010. Isolasi dan optimasi Protease bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung. *Skripsi*. Bogor. Departemen Biokimia FMIPA IPB Bogor.
- Janzen, J.J, Bioshop, J.R, Bodiene, A.B.1982. *Relationship of protease activity ruself life of skim and whole milk*. J Dairy Sci 65:2237-2240.
- Jawetz, Melnick; dan Adellberg'S. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta. Salemba Medika.
- Kobayashi Y, Kubo H, Kinoshita T (1987). *Flourometric determination of guanindo compounds by new postcolumn derivation system using reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography*. Anal. Biochem.
- Lay, B.w. 1994. Analisis mikroba di Laboratorium. Jakarta: PT. Gradindo Persada.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid I. Jakarta: Erlangga.
- Lehninger. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia I*. Jakarta: Erlangga.
- Lestari, P. 2000. Ulasan: *Eksplorasi Enzim Termostabil Dari Mikroba Termofil*. Hayati. 7: 0854-8587.
- Moran LA, Scrimgeour KG, Horton HR, Ochs RS. & Rawn JD. 1994. *Biochemistry*. Socond edit, Prentice Hall, inc. Upper Saddle River.
- Mubarik NR, Suwanto A dan Suhartono MT. 2000. Isolasi danm karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Termofilik Ekstrim. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*. Mikrobiologi, Enzim dan Bioteknologi dalam Prespektif Ekonomi dan Industri. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta. www.iptek.net.id (Diakses tanggal 13 November 2016).
- Nadeak, M. R. 2005. Studi Isolat Actinomycetes Penghasil Protease Dari Sponge Diperairan Lelanga Teluk Lampung. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Nam, et al. 2004. Galaktosidase gene of Thermopilus KNOUC 112 isolated from hot springs of a volcano area a New Zaeland: identification bacteria , cloning, and experience of the gene in *Escheria coli*. J Anim Sci 17:1591-1598.
- Niola Elidar dan Nunuk Wudyastuti. 2002. Isolasi, Seleksi, Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi, Bidang Mikrobiologi, LIPI* vol: 6.

- Novianti, T, Ardiningsih, P, Rahmalia, W. 2012. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora Diels*). JKK, tahun 2012, vol: 1 (1), hal: 45-48.
- Oxoid. 2004. Gram negative identification system. <http://www.oxoid.com/uk/indek.asp?mpage=productdetail&pre>
- Pelczar, M. J., dan Chan E. C. S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Pawiroharsono, S. 2008. Penerapan Enzim Untuk Penyamakan Kulit Ramah Lingkungan. Pusat Teknologi Bioindustri Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Jakarta.
- Purwanto, A dkk, 2014. Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Rndemen dan Aktivitas Antioksidan dalam Ekstrak Minyak bekatul. Surakarta: Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sebelas Maret. Diakses tanggal 9 Oktober 2016.
- Peodjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Poliana J. and A.P. MacCabe. 2007. *Industrial Enzymes: Structure, Function, and Applications*. Dordrecht, Springer. ISBN. Hal 24.
- Pratiwi, Silvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.
- Prescott, S. C. dan C.G. Dunns. 1999. *Industrial Microbiology*. Wesport. Conectitut: The AVI Publishing Co. Inc.
- Quthb, S. 2002. Tafsir fi Zhilalil Qur'an, Di bawah Naungan Al-qur'an (Surah Al-An'aam-Surah Al-a'raaf 137) jilid 4. Jakarta: Gema Insani Press.
- Rachman, a. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor. IPB.
- Ramadzanti A. 2006. Aktivitas Protease Dan Kandungan Asam Laktat Pada Yoghurt Yang Dimodifikasi Bifidobacterium Bifidum. *Skripsi*, Bogor: Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Rao MB Tanksale AM, Ghatge MS, Desphande VV. 1998. *Molucular And Biotechnologi Aspects Of Microbialproteteases*. Microbol Mol Biol 62 (3): 597-635.
- Rochima, E. 2006. Pemurnian Dan karakterisasi Kitin dari Bacillus papandayan Asal Kawah Kamojang Jawa Barat. Fakultas Perikanan dan ilmu Kelautan Universitas Padjajaran, Jatingor. Bandung. 8:193-209

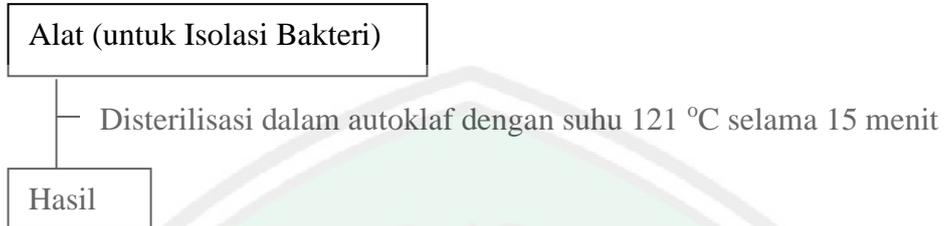
- Safitri, Y. A. 2011. Pengaruh Pemberian Bakteri *Bacillus Firmus* Terhadap Jumlah Bakteri *Vibrio Harveyi* Dan Kelulushidupan Udang Vanname (*Litopenaeus Vannemei*). Tesis. Universitas Brawijaya.
- Sadikin M. 2002. *Biokimia Enzim*. Jakarta: Widya Medika.
- Saurina J, Hernández-Cassou S (1994). "Determination of amino acids by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate". *Journal of Chromatography A*. 676 (2): 311–9
- Shihab, MQ. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, kesan dan Keserasian Al-ur'an* Volume 12. Jakarta: lentera Hati.
- Silaban, R, Panggabean, FTM, Rahmadani, Soripada, TA. 2012. Studi Pemanfaatan Enzim Papain Getah Buah Pepaya Untuk Melunakkan Daging. Artikel-Studi-JPKim-Vol-5-1-13.
- Siregar, H. 1981. *Budidaya Tanaman Padi Indonesia*. Bogor: Sastra Hudaya.
- Stanbury, PF, Whitaker, A. 1984. *Principle of Fermentation Technology*, New York: Pergamon Pr
- Sumardi dan Lengkana, D. 2009. Isolasi *Bacillus* Penghasil Protease dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung. Seminar Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Universitas Lampung.
- Suhartono, MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: IPB Press.
- Suhartono, MT. 1992. *Protease*. Bogor: IPB Press.
- Sugiarto. 2001. Teknik Sampling. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Toha, Abdul Hamid A. 2001. *Biokimia: Metabolisme Boimolekul*. Bandung: Alfabeta
- Tortora, G., Fince, B.R. and Case, C,L, 2001. *Introduction Microbiologi* edisi 7. San Fransisco Spanyol: Addison Weasly angman.
- Umsl, 2008. *Staining Bacteria*. www.umsl.edu/~microbes/pdf/stainingbacteria.pdf. Diakses pada tanggal 11 Desember 2016.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markham. Jakarta: Erlangga.
- Waluyo, L. 2005. *Mikroboilogi Umum*. Malang: UMM Press.

- Ward OP. 1983. *Properties of Microbial Proteinase Forgaty W Microbial Enzym and Biotechnology*. London: Applied Sci.
- Widayanti, A 2006. Isolasi Pengelompokan warna dan optimasi.
- Widiowati, S. 2001. Pemanfatan Hasil samping Penggilingan Padi Menunjang Sistem Agroindustri di Pedesaan. *Jurnal Penelitian Bioteknologi Tanaman pangan*. Bogor: Buletin AgroBio. Vol 4 (1): 33-38.
- Widhyastuti, N dan Dewi. R. 2001. Isolasi bakteri proteolitik dan optimasi produksi protease. Laporan Teknik Proyek Inventarisasi dan karakterisasi Sumberdaya Hayati. Pusat Peneliatian Biologi. LIPI
- Winarno. FG. 1983. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia.
- Winarno, F.G, 1985. Kedelai Bahan Pangan Masa Depan. Pusbangtepa IPB, Bogor.
- Wulandari, M dan Handasari, E. 2010. Pengaruh Penambahan Bekatul Terhadap Kadar Protein Dan Sifat Organoleptik Biskuit. Semarang: Program Studi D III Gizi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Diakses tanggal 10 Oktober 2016.
- Yusriah dan Nengah Dwianita Kuswitary. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium sp.* *Jurnal Sains dan Seni POMITS*. Volume 2. Nomor 1.

LAMPIRAN

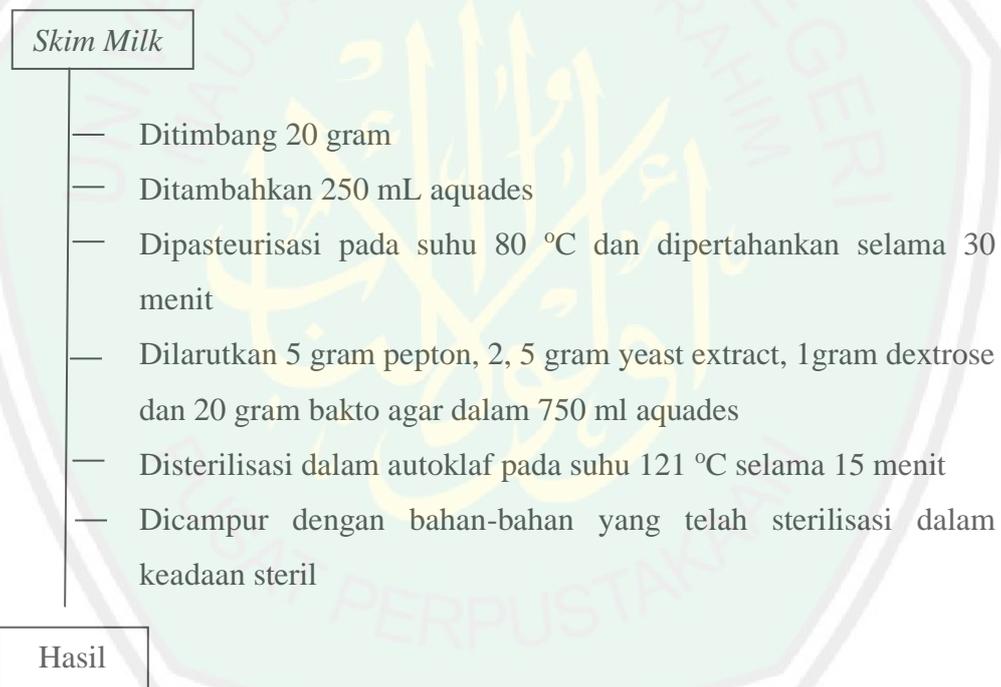
Lampiran 1. Metode Kerja

3.5.1 Tahap Preparasi alat dan Bahan

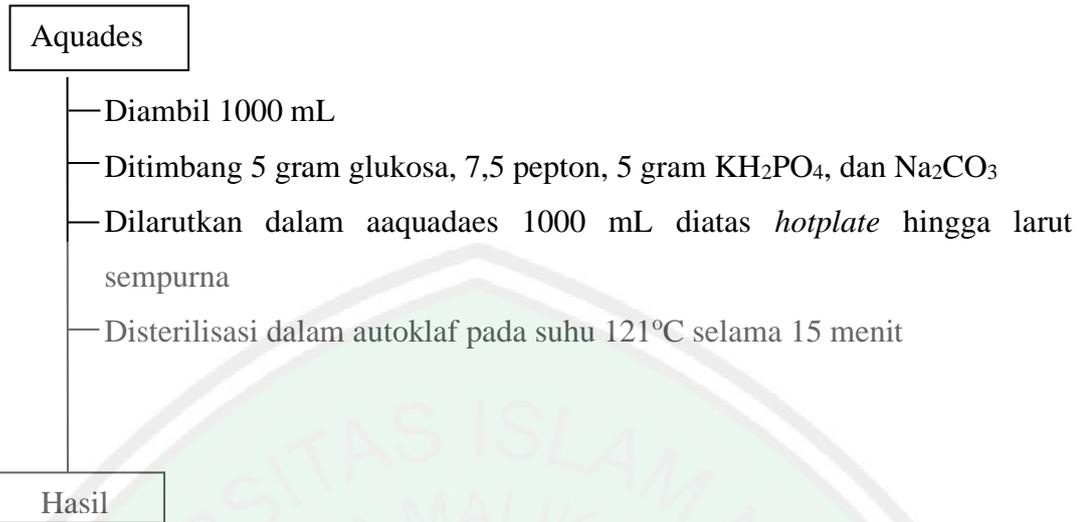


3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 *Skim Milk Agar (SMA)*



3.5.2.2 Media Garam Mineral



3.5.3 Isolasi Bakteri

Bekatul

- Ditimbang 5 gram
- Ditambah aquades steril 45 mL
- Dishaker (pengenceran 10^{-1})
- Diinkubasi selama 7 hari
- Dilakauakan pengenceran bertingkat sampai 10^{-10} (dengan mengambil 1 mL dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengsan 9 mL aquades steril)
- Diambil 1 ml dan dimasukkan kedalam cawan petri ntuk ditanam secara *pour plate* menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA) pengeceran 10^{-3} sampai 10^{-10}
- Di inkubasi pada suhu ruang selama 72 jam
- Diamati morfologinya (koloni yang dihasilkan dari isolasi)
- Dipindahkan pada agar miring untuk pemurnian (koloni yang terpisah)
- Diambil satu ose isolat mikroba
- Ditumbuhkan pada media *Skim Milk Agar* dengan media streak kuadran (konfirmasi sigle koloni)
- Disimpan isolat pada media miring *Skim Milk Agar* (SMA) untuk perlakuan selanjutnya

Hasil

3.5.4 Identifikasimakroskopis dan Mikroskopis

3.5.5 Identifikasi Mikroskopis

3.5.5.1 Pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1990).

Isolat (24 jam)

- Diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis
- Disuspensikan dengan aquades yang ada diatas gelas objek
- Difiksasi preparat diatas api bunsen sampai kering
- Ditetesi dengan larutan kristal ungu, didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan
- Ditetesi dengan larutan iodin, didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan juiair mengalir, dikeringkan
- Ditetesi dengan larutan safranin didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan
- Ditetesi dengan minyak imersi, diamati dengan mikroskopis (uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah)

Hasil

3.5.5.2 Uji Katalase (Lay, 1994).

Isolat (24 jam)

- Diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis
- Disuspensikan dengan aquades yang ada diatas gelas objek (yang sebelumnya disemprot gelas obyek dengan etanol 70 % sampai tidak terbentuk lapisan minyak)
- Difiksasi preparat diatas api bunsen sampai kering
- Ditetesi dengan larutan H₂O₃ 3 %
- Diamati pembentukan gelumbang udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung gas menandai bahwa bakteri bersifat aerobik (uji katalase tersebut positif)

Hasil

3.5.5.3 Pewarnaan Endospora (Lay, 1994).

Isolat (3 Hari)

- Diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis
- Disuspensikan dengan aquades steril yang ada digelas objek
- Difiksasi dengan *Malacit green*
- Diletakkan diatas kawat yang sudah dipanaskan diatas air mendidih selama 10 menit
- Dicuci dengan hati-hati dengan air mengalir
- Ditetesi dengan menggunakan safranin
- Didiamkan selama 30 detik
- Dicuci menggunakan air mengalir
- Dikeringkan dengan hati-hati
- Diamati dengan mikroskopis (uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau)

Hasil

3.5.6 Pembuatan Kurva Bakteri

Isolat

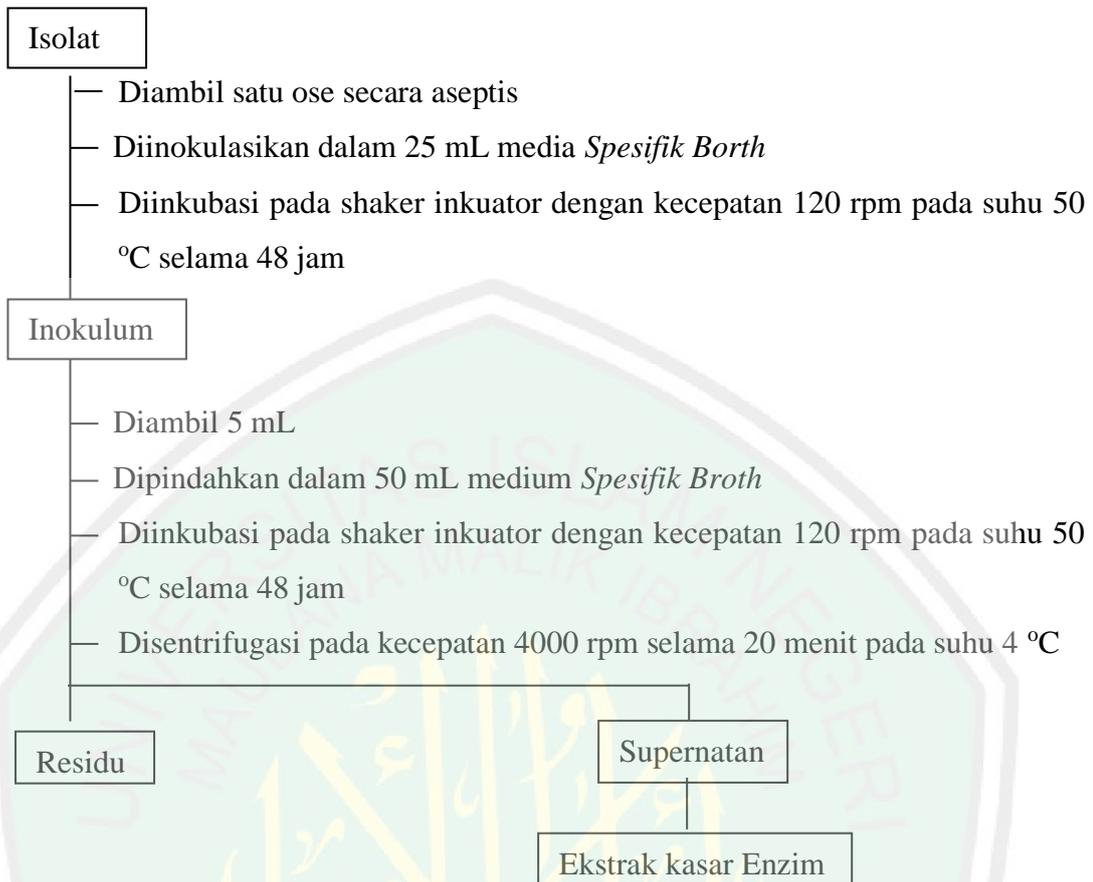
- Diambil satu ose
- Dimasukkan kedalam 50 mL medium *Spesifik Broth*
- Digoyang dengan shaker pada kecepatan 125 rpm selama 24 jam

Inokulum

- Diambil 20 mL
- Dipindahkan dalam 200 mL medium *Spesifik Broth*
- Diambil 3 mL dari masing-masing inokulum (tiap 4 jam sekali sampai awal fasa stasioner)
- Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm dengan menggunakan *spectrofotometer uv-visse* hingga didapatkan nilai OD (Optical Density)]
- Dibuat plot antara waktu dan log jumlah bakteri per mL

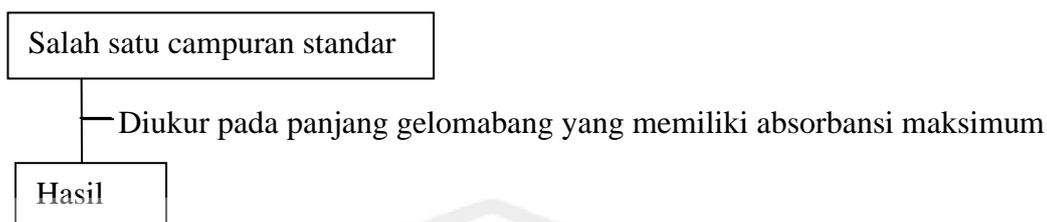
Hasil

3.5.7 Produksi Protease

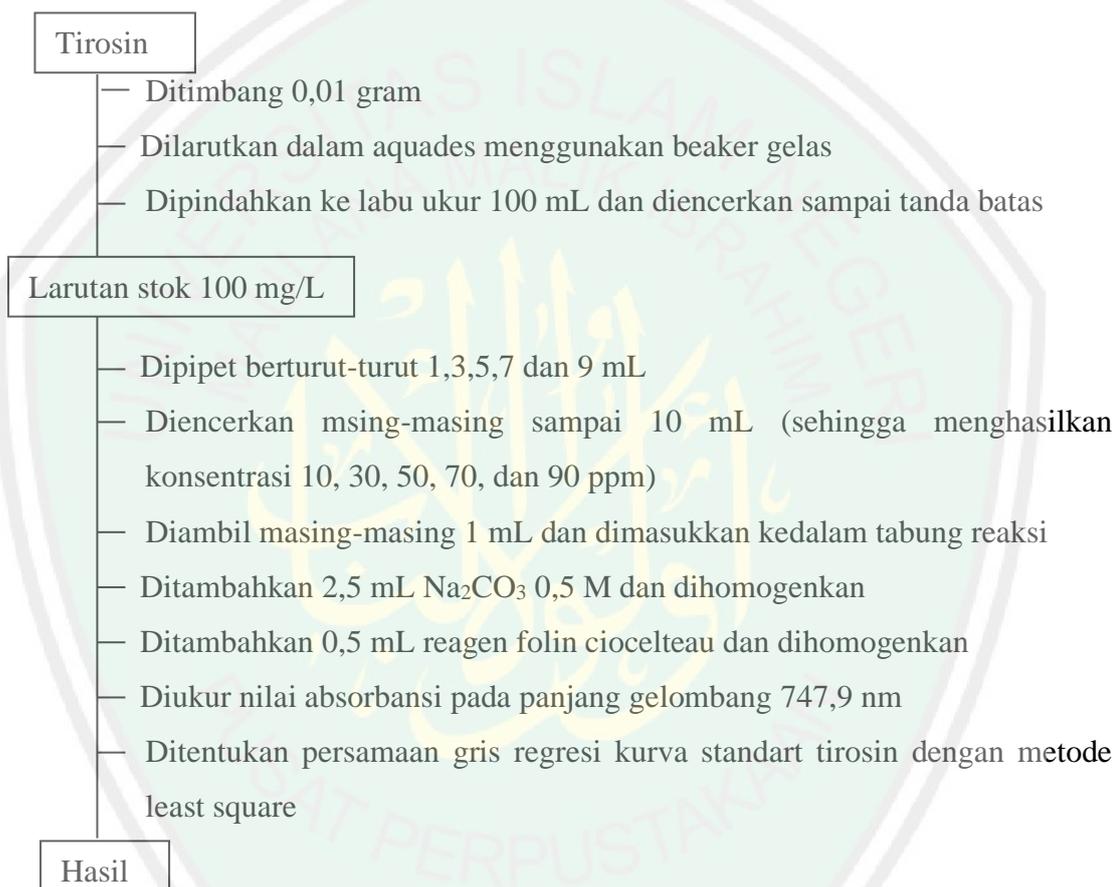


3.5.8 Uji Aktivitas Protease Kasar

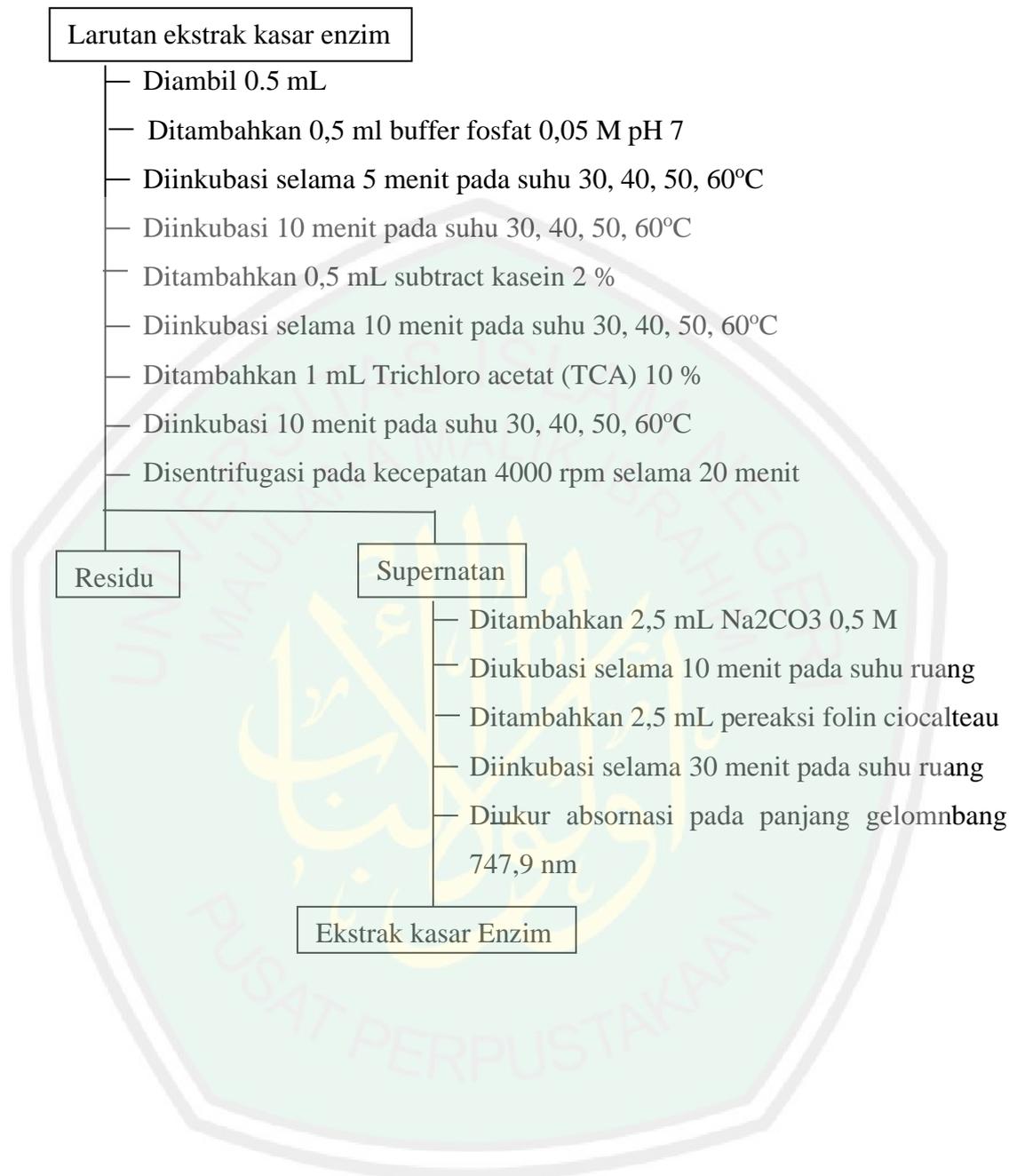
3.5.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



3.5.8.1 Pembuatan Kurva Standart Tirosin (Adrian, dkk., 2015)



3.5.9 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease (Fathimah dan Wardani, 2014).



Lampiran 2. Pembuatan Media dan Reagen

2.1 Pembuatan Media Skim Milk Agar dalam 1000 mL

- a. 20 gram susu skim dalam 250 aquades (dipesteurisasi pada suhu 80 °C dan pertahankan selama 30 menit)
- b. Dilarutkan 5 gram peton, 2,5 gram yeast ekstrak, dan 1,0 gram dan 20 gram bakto agar dalam 750 mL aquades (diseterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit).
- c. Susu skim yang di pesteurisasi dicampur dengan bahan-bahan yang telah disterilisasi dalam keadaan steril.

2.2 Pembuatan Media Garam Mineral

- a. Sebanyak 5 gram glukosa, 7,5 gram pepton, 5 gram KH_2PO_4 , dan 5 gram MgSO_4 di larutkan ke dalam 1000 mL aquades (di seterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit).

Lampiran 3. Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) dan Aktivitas Enzim**Protease**

Rumus indeks proteolitik : $\frac{a}{b}$

Keterangan:

a = diameter zona bening

b = diameter koloni (Setyaningsih, 2013)

$$\begin{aligned} - \text{ Isolat J} &= \frac{a}{b} \\ &= \frac{4,6}{1,3} \\ &= 3,5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ Isolat K} &= \frac{a}{b} \\ &= \frac{6,7}{1} \\ &= 6,7 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ Isolat L} &= \frac{a}{b} \\ &= \frac{4,8}{1} \\ &= 4,8 \end{aligned}$$

a. Pembuatan Larutan Standart Tirosin

Cara membuat larutan stok tirosin 0,04 mg/mL

$$0,04 \text{ mg/mL} = \frac{0,01 \text{ gram}}{250 \text{ mL}} = \frac{10 \text{ mg}}{250 \text{ mL}}$$

Untuk membuat larutan stok tirosin 0,04 mg/mL dibutuhkan 0,1 g tirosin kemudian dilarutkan ke dalam 250 mL aquades. Selanjutnya dibuat larutan tirosin dengan konsentrasi 0,004, 0,012, 0,020, 0,028, 0,036 mg/mL dengan menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

a. Konsentrasi 0,004 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$1 \text{ mL} \times 0,04 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$\frac{0,04 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = M_2$$

$$0,004 \text{ mg/mL}$$

b. Konsentrasi 0,012 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$3 \text{ mL} \times 0,04 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$\frac{0,012 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = M_2$$

$$0,0012 \text{ mg/mL}$$

c. Konsentrasi 0,020 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$5 \text{ mL} \times 0,04 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$\frac{0,020 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = M_2$$

$$0,0020 \text{ mg/mL}$$

d. Konsentrasi 0,004 mg/mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$7 \text{ mL} \times 0,04 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$\frac{0,028 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = M_2$$

$$0,0028 \text{ mg/mL}$$

e. Konsentrasi 0,004 mg/mL

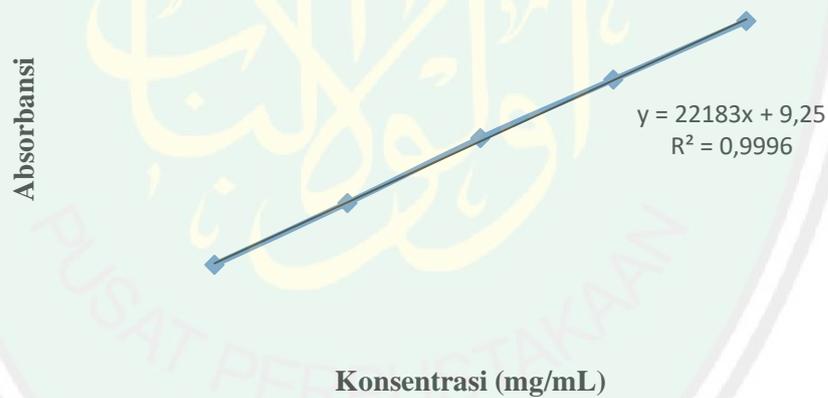
$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$9 \text{ mL} \times 0,04 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$\frac{0,036 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = M_2$$

$$0,0036 \text{ mg/mL}$$

Gambar 4.6 Kurva Standart Tirosin



Data Konsentrasi Tirosin Setelah Dimasukkan Persamaan Garis Regresi y

$$= 22.183x + 0,0093$$

b. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar *Protesae*

$$\text{Rumus Perhitungan Enzim (Ae)} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

Diketahui : - konsentrasi tirosin pada ulangan I dan ulangan II.

Isolat	Suhu	Ulangan I	Ulangan II
J	30	0,7231	0,6381
	40	0,7772	0,6923
	50	0,7709	0,7010
	60	0,8530	0,6732
K	30	0,6716	0,6577
	40	0,7344	0,6107
	50	0,7375	0,6657
	60	0,8902	0,6699
L	30	0,6485	0,6485
	40	0,5874	0,5874
	50	0,5960	0,5960
	60	0,6224	0,6224

Ulangan I

- Mr Tirosin = 181
- v = 2 mL
- p = 0,5 mL
- q = 10 menit

$$\begin{aligned} \text{- (Ae) J } 30^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,7231}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00399 \times 70 \\ &= 0,2793 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{- (Ae) J } 40^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,7772}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \end{aligned}$$

$$= 0,00429 \times 70$$

$$= 0,3003 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) J } 50^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,7709}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00426 \times 70$$

$$= 0,2982 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) J } 60^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,853}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00471 \times 70$$

$$= 0,3297 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) K } 30^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,6712}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00371 \times 70$$

$$= 0,2596 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) K } 40^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,7344}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00406 \times 70$$

$$= 0,2840 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) K } 50^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,7375}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00407 \times 70$$

$$= 0,2852 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) K } 60^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6712}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \end{aligned}$$

$$= 0,00499 \times 70$$

$$= 0,3443 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 30^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6888}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \end{aligned}$$

$$= 0,0038 \times 70$$

$$= 0,266 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 40^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6982}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \end{aligned}$$

$$= 0,00386 \times 70$$

$$= 0,2702 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 50^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,8058}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \end{aligned}$$

$$= 0,00445 \times 70$$

$$= 0,3171 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 60^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{Mr \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,199}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \end{aligned}$$

$$= 0,00453 \times 70$$

$$= 0,3171 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned}
 - \text{ (Ae) M } 30 \text{ }^{\circ}\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\
 &= \frac{0,7254}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\
 &= 0,00408 \times 70 \\
 &= 0,2807 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 - \text{ (Ae) M } 40 \text{ }^{\circ}\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\
 &= \frac{0,7384}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\
 &= 0,00408 \times 70 \\
 &= 0,2856 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 - \text{ (Ae) M } 50 \text{ }^{\circ}\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\
 &= \frac{0,7974}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\
 &= 0,00439 \times 70 \\
 &= 0,3073 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 - \text{ (Ae) M } 60 \text{ }^{\circ}\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\
 &= \frac{0,7568}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\
 &= 0,00418 \times 70 \\
 &= 0,2968 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

Ulangan II

- Mr Tirosin = 181
- v = 2 mL
- p = 0,5 mL
- q = 10 menit
-
- (Ae) J 30 °C = $\frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$

$$= \frac{0,6381}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00353 \times 70$$

$$= 0,2471 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) J } 40^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,6923}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00382 \times 70$$

$$= 0,2674 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) J } 50^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,7010}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00387 \times 70$$

$$= 0,2709 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) J } 60^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,6732}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00372 \times 70$$

$$= 0,2604 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) K } 30^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,6577}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00363 \times 70$$

$$= 0,2541 \text{ U/mL}$$

$$- \text{ (Ae) K } 40^\circ\text{C} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q}$$

$$= \frac{0,6107}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10}$$

$$= 0,00337 \times 70$$

$$= 0,2359 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) K } 50^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6657}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00368 \times 70 \\ &= 0,2576 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) K } 60^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6699}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,0037 \times 70 \\ &= 0,259 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 30^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6485}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00358 \times 70 \\ &= 0,2506 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 40^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,5874}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00324 \times 70 \\ &= 0,2284 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 50^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{M_r \text{ tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,5960}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00329 \times 70 \end{aligned}$$

$$= 0,2303 \text{ U/mL}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) L } 60^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6229}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00344 \times 70 \\ &= 0,2402 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) M } 30^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6111}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00338 \times 70 \\ &= 0,2366 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) M } 40^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6016}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00332 \times 70 \\ &= 0,2324 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) M } 50^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6584}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00364 \times 70 \\ &= 0,2548 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ (Ae) M } 60^\circ\text{C} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \\ &= \frac{0,6313}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 10} \\ &= 0,00349 \times 70 \\ &= 0,2443 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Lampiran 4. Gambar



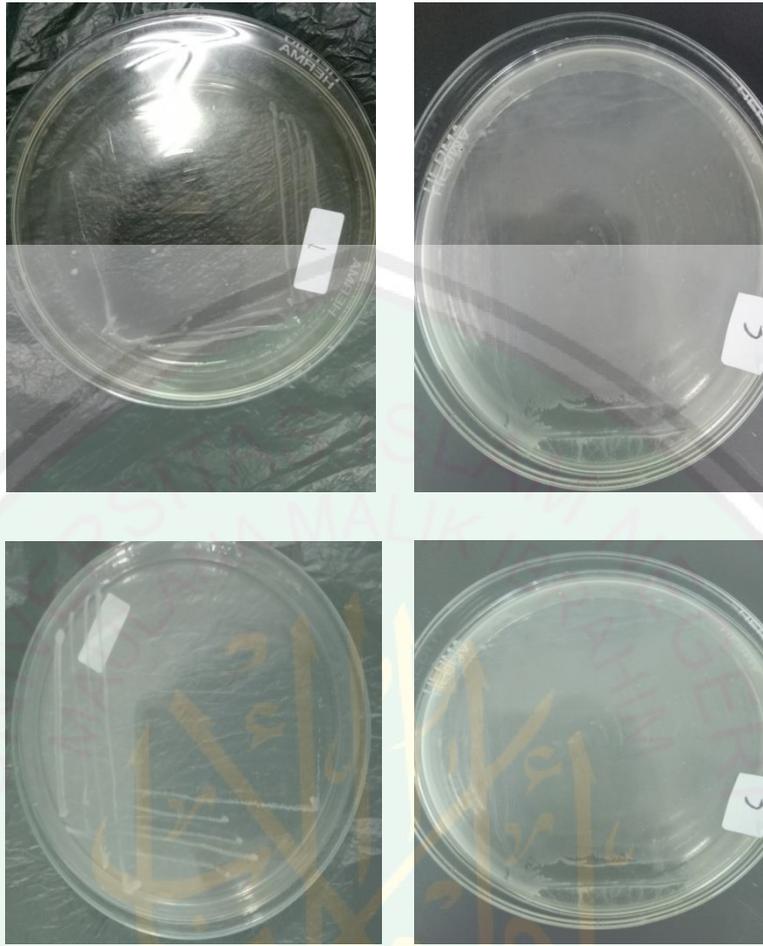
Uji aktivitas enzim protease kasar



Perendaman baktul dalam akuades selama 3 hari



Proses sterilisasi alat



Hasil streak kuadran isolat bakteri yang diisolasi dari bekatul