

**PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE DARI BAKTERI PROTEOLITIK *INDIGENOUS* BEKATUL**

SKRIPSI

**Oleh:
MAGHIROH NUR LAILI
NIM. 14630026**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE DARI BAKTERI PROTEOLITIK *INDIGENOUS* BEKATUL**

SKRIPSI

**Oleh:
MAGHFIROH NUR LAILI
NIM. 14630026**

**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)**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE DARI BAKTERI PROTEOLITIK *INDIGENOUS* BEKATUL**

SKRIPSI

Oleh:
MAGHFIROH NUR LAILI
NIM. 14630026

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 22 Juni 2021

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Rif'atul Mahmudah, M.Si
NIDT.19830125 20160201 2 068

Mengesahkan,
Ketua Program Studi



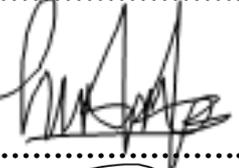
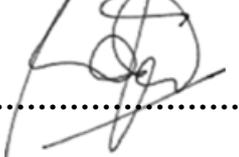
Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE DARI BAKTERI PROTEOLITIK *INDIGENOUS* BEKATUL**

SKRIPSI

Oleh:
MAGHFIROH NUR LAILI
NIM. 14630026

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 22 Juni 2021**

| | | |
|---------------------------|--|--|
| Penguji Utama | : Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002 |  (.....) |
| Ketua Penguji | : Fadilah Nor Laili Lutfia, M.Biotech NIDT. 63033 |  (.....) |
| Sekretaris Penguji | : Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750730 200312 2 001 |  (.....) |
| Anggota Penguji | : Ri'atul Mahmudah, M. Si NIP. 19860512 201903 1 002 |  (.....) |

Mengesahkan,
Ketua Program Studi



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Maghfiroh Nur Laili
NIM : 14630026
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri Proteolitik *Indigenus* Bekatul

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, 24 Juni 2021



Maghfiroh Nur Laili
NIM. 14630026

MOTTO

Start with confidence

Run with sincerity

Run with happiness

Besar kecil apapun yang kau dapat, tetaplah selalu bersyukur.

Karena sesungguhnya

Allah mencintai hambanya yang pandai mensyukuri nikmat-Nya

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Dengan rasa hormat, terima kasih, dan penghargaan setinggi-tingginya
kupersembahkan karya tulis ini kepada:

Ayah (*H. R. Zakariya, S.PdI*) dan Ibu (*Hj. Nurhyatin*)

Dearest my son (*M. Sirojul*)

Terimakasih atas semua doa, support, serta semua pengorbanan yang tiada henti-hentinya mengalir untuk mengantarkanku menjadi orang yang berpendidikan dan mengerti arti perjuangan dalam kehidupan

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur *Alhamdulillah* penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI PROTEOLITIK *INDIGENOUS* BEKATUL”**. Shalawat dan salam selalu penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW, sosok teladan personal dalam membangun *role* model peradaban dan budaya pemikiran.

Selanjutnya penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. Akyunul Jannah, S. Si, M.P., selaku pembimbing utama yang selalu sabar memberikan ilmu, pengarahan, bimbingan, nasihat, waktu, tenaga dan petunjuk selama penyusunan skripsi
5. Ibu Fadilah Nor Laili Lutfia, M. Biotech, selaku konsultan yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan dalam menyempurnakan skripsi ini.
6. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si., selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan evaluasi dan saran dalam penulisan skripsi.

7. Rif'atul Mahmudah, M.Si., selaku dosen agama yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini khususnya dibidang keagamaan.
8. Segenap civitas akademika Jurusan Kimia, terutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
9. Seluruh laboran dan staff administrasi Jurusan KimiaUin Malang.
10. Kedua orang tua tercinta, Ayah H. Zakariya dan Hj. Nurhayatin yang telah menjadi orang tua yang paling hebat dan selalu memberikan kasih sayang, do'a, restu, ridho, nasehat, dan dukungan moral maupun material kepada penulis dalam menuntut ilmu. Semoga Allah selalu memberikan perlindungan dan kasih sayang kepada Ayah dan Ibu.
11. Adik tersayang Ijul, dan semua keluarga besar yang telah memberikan do'a dan semangat.
12. Semua pihak yang telah membanu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril.
13. Teman Kimia Angkatan 14 khususnya Kimia-A yang selalu kompak dalam suka maupun duka serta selalu memberikan ilmu, sharing ilmu dan pengalaman dengan penulis.

Penulis menyadari atas terbatasnya ilmu yang penulis miliki. Penulis skripsi ini tentu masih jauh dari kata sempurna. Mohon maaf apabila terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga dapat memberikan manfaat kepada para pembaca, khususnya bagi penulis. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Malang, 06 Februari 2021

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSETUJUAN | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iii |
| HALAMAN KEASLIAN | iv |
| HALAMAN MOTTO | v |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | vi |
| KATA PENGANTAR | vii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| ABSTRAK | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| مستخلص البحث | xvi |
| | |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1. 1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 6 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 6 |
| 1.4 Batasan Masalah | 6 |
| 1.5 Manfaat Penelitian | 7 |
| | |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | 7 |
| 2.1 Bekatul | 7 |
| 2.1.1 Pengertian Bekatul | 8 |
| 2.1.2 Morfologi dan Sifat Bekatul | 8 |
| 2.1.3 Kandungan Kimia Bekatul | 8 |
| 2.1.4 Manfaat Bekatul | 11 |
| 2.2 Bakteri Proteolitik | 11 |
| 2.2.1 Jenis-Jenis Bakteri Proteolitik | 12 |
| 2.2.2 Mekanisme Kerja Protease | 13 |
| 2.3 Protease | 15 |
| 2.3.1 Enzim Protease | 15 |
| 2.3.2 Klasifikasi Protease | 16 |
| 2.3.3 Sumber Protease | 18 |
| 2.3.4 Kegunaan Protease | 19 |
| 2.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim | 20 |
| 2.5 Penentuan Aktivitas Enzim | 23 |
| | |
| BAB III. METODE PENELITIAN | 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 | 27 |
| 3.5 Pelaksanaan Penelitian | 27 |
| 3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan | 27 |
| 3.5.2 Pembuatan Media | 28 |
| 3.3.2.1 Media <i>Nutrient Agar</i> | 28 |
| 3.3.2.2 Media Spesifik <i>Borth</i> | 28 |
| 3.5.3 Peremajaan Isolat | 28 |
| 3.5.4 Pembuatan Kurva Standar Tirosin | 28 |
| 3.5.5 Produksi Enzim Protease dari Bakteri Proteolitik..... | 39 |
| 3.5.6 Uji Aktivitas Bakteri Proteolitik dengan Variasi pH dan Suhu | 39 |
| 3.5.7 Analisis Data | 30 |
| BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | 31 |
| 4.1 Produksi Protease dari Bakteri Proteolitik | 31 |
| 4.2 Uji Kemampuan Aktivitas Bakteri Proteolitik secara Kuantitatif Penelitian..... | 32 |
| 4.2.1 Kurva Standar Tirosin | 32 |
| 4.2.2 Uji Aktivitas Protease | 34 |
| 4.2.3 Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease | 37 |
| 4.3 Pemanfaatan Bekatul dalam Prespektif Islam..... | 46 |
| BAB V PENUTUP | 49 |
| DAFTAR PUSTAKA | 50 |
| LAMPIRAN..... | 55 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 2.1. Bekatul | 9 |
| Gambar 2.2. Reaksi pemecahan ikatan peptida | 14 |
| Gambar 2.3. Skema mikroba protease | 18 |
| Gambar 4.1 Kurva larutan Standar Tirosin | 33 |
| Gambar 4.2 Reaksi Hidrolisis Kasein (Ikatan Peptida)menjadi Asam Amino | 36 |
| Gambar 4.3 Reaksi antara Follin-Ciocalteau dengan Asam Amino | 36 |
| Gambar 4.4 Grafik Aktivitas Enzim Protease dari <i>Indigenous</i> Bekatul berdasarkan Variasi pH dan Suhu | 40 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 2.1 Sumber enzim Protease | 17 |
| Tabel 2.2 Klasifikasi Protease..... | 17 |
| Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Suhu dan pH | 27 |
| Tabel 4.1 Hasil uji ANOVA pengaruh pH dan Suhu dan Interaksi keduanya..... | 38 |
| Tabel 4.2 Hasil Uji DUCAN Interaksi pH dan Suhu terhadap Aktivitas Enzim Protease | 39 |

LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 1 Rancangan Penelitian.. | 55 |
| Lampiran 2 Diagram Alir..... | 56 |
| Lampiran 3 Pembuatan Media dan Reagen. | 60 |
| Lampiran 4 Pembuatan Larutan Standart Tirosin | 61 |
| Lampiran 5 Perhitungan..... | 64 |
| Lampiran 6 Gambar Penelitian. | 69 |
| Lampiran 7 Hasil Output SPSS..... | 70 |

ABSTRAK

Laili, M.N. 2020. Pengaruh pH dan Suhu terhadap aktivitas Protease Dari Bakteri Proteolitik Indigenous Bekatul. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Kata Kunci : *Indigenous* Bekatul, Bakteri Proteolitik, pH, Suhu.

Industri enzim di Indonesia masih diimpor padahal di Indonesia sumber daya alam untuk pembuatan enzim melimpah, salah satunya enzim protease. Protease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Bekatul dapat digunakan sebagai substrat dalam produksi enzim protease. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan Suhu terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri proteolitik indigenous bekatul.

Penelitian ini dilakukan secara kuantitatif dengan rancangan acak lengkap pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Faktor yang digunakan adalah pH dengan variasi pada pH 6, 7, 8, 9 dan suhu dengan variasi suhu 30°C, 37°C, 40°C, 45°C. Produksi bakteri proteolitik dari bekatul dilakukan dengan menggunakan media *Nutrient Agar* dan media *Nutrient Borth*. Uji yang dilakukan yaitu uji aktivitas bakteri proteolitik dengan variasi pH dan suhu. Data variasi suhu dan pH terhadap aktivitas protease dianalisis untuk mengetahui apakah berpengaruh nyata atau tidak terhadap uji statistik *two way ANOVA*.

Hasil penelitian didapatkan aktivitas tertinggi enzim protease diperoleh pada perlakuan suhu 37°C pada pH 7 dengan aktivitas enzimnya sebesar 0,01288 U/mL. Aktivitas enzim terendah diperoleh pada perlakuan suhu 45°C pada pH 8 dengan aktivitas enzimnya sebesar 0,00753 U/mL. Hasil penelitian ini didapatkan kesimpulan bahwa tidak ada pengaruh yang berbeda nyata antara pH dan suhu terhadap aktivitas enzim protease dari *indigenous* bekatul. Enzim akan bekerja maksimal dan efisien jika berada pada kondisi yang optimum.

ABSTRACT

Laili, M.N. 2020. The Effect of pH and Temperature on the Activity of Protease Enzyme from *Indigenous* Proteolytic Bacteria Bran. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang.

Keywords: *Indigenous* Bran, Proteolytic Bacteria, pH, Temperature.

The enzyme industry in Indonesia is still imported, whereas in Indonesia there are abundant natural resources for the manufacture of enzymes, one of which is the protease enzyme. Protease is an enzyme that can hydrolyze protein into simpler compounds. Bran can be used as a substrate in the production of protease enzymes. This study aims to determine the effect pH and temperatur for protease activity from *indigenous* proteolytic bacteria of rice bran.

This research was conducted quantitatively with a completely randomized design with a factorial pattern consisting of 2 factors. Each factor was repeated 2 times. The factors used are pH with variations in pH 6, 7, 8, 9 and temperatures with temperature variations of 30 ° C, 37 ° C, 40 ° C, 45 ° C. The production of proteolytic bacteria from rice bran was carried out using Nutrient Agar and Borth Nutrient media. The test carried out was the proteolytic bacteria activity test with variations in pH and temperature. Data on temperature and pH variations on protease activity were analyzed to determine whether or not they had a significant effect on the two-way ANOVA statistical test.

The results showed that the highest activity of the protease enzyme was obtained at 37 ° C at pH 7 with the enzyme activity of 0.01288 U / mL. The lowest enzyme activity was obtained at a treatment temperature of 45 ° C at pH 8 with the enzyme activity of 0.00753 U / mL. The results of this study concluded that there was no significant difference between pH and temperature on the protease enzyme activity of *indigenous* bran. Enzymes will work optimally and efficiently under optimum conditions.

مستخلص البحث

ليلي ، م. ن. (٢٠٢١). تأثير درجة الحموضة ودرجة الحرارة على نشاط إنزيم البروتياز للبكتيريا المحللة للبروتين في نخالة الأرز الأصلية. قسم الكيمياء ، كلية العلوم و التكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج.

الكلمات المفتاحية: النخالة الأصلية ، البكتيريا المحللة للبروتين ، نشاط الإنزيم ، درجة الحموضة ، درجة الحرارة

تزال صناعة الإنزيمات في إندونيسيا مستوردة ، بينما في إندونيسيا توجد موارد طبيعية وفيرة لتصنيع الإنزيمات ، أحدها هو إنزيم البروتياز. البروتياز هو إنزيم يمكنه تحلل البروتين إلى مركبات أبسط. يمكن استخدام النخالة كركيزة في إنتاج إنزيمات البروتياز. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم البروتيني من البكتيريا المحللة للبروتين في نخالة الأرز.

تم إجراء هذا البحث كمياً بتصميم عشوائي تماماً بنمط عاملي يتكون من عاملين. تم تكرار كل عامل ٣ مرات. العوامل المستخدمة هي الأس الهيدروجيني مع تغيرات في الأس الهيدروجيني ٦ ، ٧ ، ٨ ، ٩ ، ودرجات الحرارة مع تغيرات في درجات الحرارة من ٣٠ درجة مئوية ، ٣٧ درجة مئوية ، ٤٠ درجة مئوية ، ٤٥ درجة مئوية. تم إنتاج البكتيريا المحللة للبروتين من نخالة الأرز باستخدام وسائط الأجار المغذي (*Nutrient Agar*) و المرق مغذي (*Nutrient Borth*). كان الاختبار الذي تم إجراؤه هو اختبار نشاط البكتيريا المحللة للبروتين مع اختلافات في درجة الحموضة و درجة الحرارة. تم تحليل بيانات التغيرات في درجة الحرارة و درجة الحموضة على نشاط البروتياز لتحديد ما إذا كان لها تأثير كبير على اختبار ANOVA الإحصائي ثنائي الاتجاه (*two way ANOVA*) أم لا.

أظهرت النتائج أن النشاط الأمثل لإنزيم البروتياز تم الحصول عليه عند درجة حرارة معالجة ٣٧ درجة مئوية عند درجة حموضة ٧ مع نشاط إنزيم ٠,٠١٢٨٨ وحدة/مل. تم الحصول على أقل نشاط إنزيم عند درجة حرارة معالجة ٤٥ درجة مئوية عند درجة حموضة ٨ مع نشاط إنزيم قدره ٠,٠٠٧٥٣ وحدة/مل. خلصت نتائج هذه الدراسة إلى عدم وجود فرق معنوي بين الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة على نشاط إنزيم البروتياز للنخالة الأصلية. ستعمل الإنزيمات بشكل مثالي وفعال في ظل الظروف المثلى.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara agraris dimana bahan makanan pokok masyarakat Indonesia adalah beras. Sebagai bahan makanan pokok, beras banyak dibudidayakan oleh petani. Produksi beras meningkat dari tahun ke tahun untuk mencukupi kebutuhan masyarakat dengan seiring meningkatnya jumlah penduduk. Data Badan Pusat Statistik (BPS) produksi beras pada tahun 2011 sebesar 65,75 juta ton dan meningkat menjadi 81,38 juta ton pada tahun 2017 (Pertanian.go.id, 2017).

Beras merupakan produk utama sebagai hasil dari proses penggilingan padi. Proses penggilingan padi menghasilkan hasil samping berupa beras menir/beras yang hancur ($\pm 5\%$), dedak/bekatul yang merupakan kulit ari yang dihasilkan dari proses penyosohan (8-12%) dan sekam yang merupakan bagian pembungkus/kulit luar biji (15-20%) (Kamandalu *et al.*, 2014). Dalam proses penggilingan padi di Indonesia, bekatul dihasilkan pada proses penyosohan kedua (Astawan dan Febrinda, 2010). Banyaknya produksi beras di Indonesia menggambarkan banyaknya bekatul yang dihasilkan. Allah SWT bersabda dalam Al-Qu'an surat Al-An'am ayat 95:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۚ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ۗ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَآ
نَّىٰ تُؤَفَّكُونَ

Artinya: “*sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuhan-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup demikian ialah Allah, maka mengapa kamu masih berpaling.*”

Menurut Tafsir Ibnu Katsir menafsirkan potongan ayat *فَالِقُ الْإِنبَاتِ وَالنَّوَى* sebagai “Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup” QS (30):19. Maksudnya adalah Allah menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang hidup dari biji dan benih, yang merupakan benda mati. Ayat ini menyiratkan bahwa Allah SWT menyebutkan tentang hasil pertanian berupa padi dan kurma. Tanaman padi merupakan salah satu hasil pertanian yang memiliki banyak manfaat, selain menghasilkan beras tanaman padi juga termasuk salah satu penghasil produk samping berupa bekatul.

Bekatul mengandung nilai gizi yang lebih tinggi daripada endosperma (beras) (Astawan dan Febrinda, 2010). Bekatul mengandung berbagai nutrisi seperti protein, lemak, serat pangan, vitamin dan mineral. Bekatul mengandung asam amino esensial berupa triptofan, histidin, sistein, dan arginin. Jenis serat pangan terdiri atas selulosa, hemiselulosa, pektin, arabinosilan, lignin, dan β -glukan. Selain itu, bekatul juga mengandung beberapa komponen bioaktif, seperti γ -oryzanol, asam ferulat, asam kafeat, tricine, asam kumarat, asam fitat, isoform vitamin E (α -tokoferol, γ -tokoferol, tokotrienol), fitosterol (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol), dan karotenoid (α -karoten, β -karoten, lutein, likopen) (Henderson *et al.*, 2012). Kandungan senyawa dalam bekatul tersebut membuat bekatul menjadi pangan fungsional yang dapat bermanfaat bagi kesehatan seperti

sebagai bahan antikanker, antihipokolesterolemik, dan antiaterogenik (Kharisma, 2015).

Bekatul dapat digunakan sebagai media yang cocok untuk pertumbuhan bakteri proteolitik. Bekatul juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan untuk isolasi bakteri proteolitik (Umayah, 2019). Hasil serupa dinyatakan oleh Badriyah dan Ardyati (2013) bahwa bekatul dapat digunakan untuk substrat isolasi bakteri protease. Aktivitas protease meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat sampai pada konsentrasi maksimum.

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida kecil dan asam amino. Protease adalah enzim proteolitik (*protein-digesting*) yang terutama diklasifikasikan berdasarkan pH optimumnya sebagai protease asam, netral, dan basa. Protease merupakan biokatalis banyak diaplikasikan secara luas di banyak industri seperti tekstil, laundry, kesehatan dll. Protease netral terutama digunakan dalam pengolahan makanan seperti pembuatan roti dan sektor perawatan kesehatan. Salah satu aplikasi terbaru dari protease yaitu memanfaatkan sifat ramah lingkungan dan dapat digunakan sebagai alat bantu pemrosesan makanan. Protease netral dapat digunakan untuk ekstraksi minyak nabati sehingga sebagian besar menggantikan pelarut organik berbahaya seperti heksana (Sumantha *et al.*, 2006). Protease menjadi satu dari tiga kelompok enzim terbesar dari industri enzim dan diperkirakan sebesar 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia (Gupta *et al.*, 2005).

Saat ini sebagian besar enzim yang digunakan dalam industri di Indonesia masih diimpor padahal potensi sumber daya alam untuk pembuatan enzim tersebut melimpah di Indonesia (Wardani dan Nindita, 2012). Pemanfaatan indigenus bekatul dalam memproduksi bakteri proteolitik merupakan wujud

pemanfaatan bahan alam khususnya hasil samping bahan pangan pokok masyarakat Indonesia menjadi bahan yang bernilai ekonomis tinggi dan mengurangi impor enzim dari negara lain.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh Umayyah (2019) dengan tujuan untuk mengisolasi bakteri proteolitik dari bekatul, dan menguji aktivitasnya berdasarkan variasi temperatur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat mempunyai aktivitas proteolitik yang baik dengan indeks proteolitik antara 3,5 sampai 6,7. Hasil uji pengaruh temperatur menghasilkan kondisi optimum aktivitas proteolitik tercapai pada suhu 30°C yang termasuk temperatur yang cukup rendah. Aktivitas proteolitik enzim tidak hanya dipengaruhi oleh temperatur, namun juga pH. Penelitian sebelumnya belum melakukan kajian pengaruh pH terhadap aktivitas proteolitik enzim protease dari bekatul. Oleh karena penelitian sebelumnya telah melakukan isolasi enzim protease dengan hasil yang baik, maka penelitian ini menggunakan isolat bakteri hasil dari penelitian Umayyah (2019).

Menurut Fardiaz (1979) penggunaan kapang untuk produksi protease lebih berkembang daripada penggunaan bakteri. Walaupun demikian bakteri merupakan mikroorganisme yang potensial untuk produksi protease selain dari kapang. Bakteri *indigenus* adalah bakteri asli yang berasal dari daerah tersebut (Koyama,1997). Bakteri *indigenus* bekatul merupakan bakteri asli yang berada dalam bekatul. Penelitian ini berupaya mengkonfirmasi ulang hasil penelitian terkait pengaruh temperatur terhadap aktivitas proteolitik enzim protease dari bekatul dan melengkapi penelitian sebelumnya dengan menambahkan pengaruh pH terhadap aktivitas proteolitik enzim protease dari *Indigenus* bekatul.

Penelitian terkait pengaruh temperatur dan pH terhadap aktivitas proteolitik bakteri protease telah dilaporkan. Badriyah dan Ardyati (2013) melakukan uji aktivitas proteolitik isolat bakteri asal ampas tahu pada substrat bekatul pada pH 7 dan suhu 37°C menghasilkan aktivitas protease sebesar 2,24 U/mL. Faizah (2017) melakukan kajian uji aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* dari daun kenikir dengan media limbah cair tahu dan dedak pada suhu 25-55°C dan pH 7-8. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas protease tertinggi sebesar 1,511 U/mL, dicapai pada suhu 55°C dan pH 8. Yusriah dan Kuswytasari (2013) menguji aktivitas protease pada *Penicillium sp.* pada media larutan Czapek dengan suhu 30-50°C dan pH 4-8. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas protease *Penicillium sp.* tertinggi sebesar 2,416 U/mL yang dicapai pada pH 8 dan suhu 40°C.

Profil pH dinyatakan mempengaruhi aktivitas protease dalam mengkatalisis suatu reaksi. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada kondisi pH tersebut struktur tiga dimensinya paling efektif dalam mengikat substrat. Apabila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimalnya, maka strukturnya akan mengalami kerusakan dan aktivitas enzim akan hilang pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1998). Selain itu pH rendah atau tinggi menyebabkan enzim terdenaturasi yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Suhu adalah faktor lingkungan penting yang juga mempengaruhi pertumbuhan dan produksi metabolit oleh mikroorganisme.

Suhu berperan penting dalam aktivasi dan inaktivasi enzim. Setiap enzim memiliki suhu optimal untuk aktivitas enzim maksimum (Sayem *et al.*, 2006). Ketika suhu dinaikkan akan menyebabkan aktivitas enzim meningkat. Hal ini

disebabkan oleh suhu yang semakin tinggi akan meningkatkan energi kinetik, sehingga akan menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Tumbukan yang sering terjadi akan mempermudah pembentukan kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang terbentuk semakin banyak (Adrio dan Demain, 2014). Kenaikan lebih lanjut di atas temperatur optimum menyebabkan protein berubah konformasi sehingga gugus reaktifnya terhambat dan aktivitas enzim menurun. Hal ini disebabkan karena enzim akan mengalami denaturasi (Baehaki, 2008).

Bakteri dan jenis substrat yang digunakan untuk produksi protease menghasilkan kondisi optimum yang berbeda-beda. Oleh karena itu, penelitian ini tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul “Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri Proteolitik *Indigenous* Bekatul”.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini yaitu Bagaimana pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri proteolitik *indigenous* bekatul?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim protease dari proteolitik *indigenous* bekatul

1.4 Batasan Penelitian

Adapun batasan penelitian sebagai berikut:

1. Isolat bakteri proteolitik hasil isolasi dari bekatul

2. Substrat yang digunakan adalah susu skim
3. Variasi pH yang digunakan adalah 6, 7, 8, 9
4. Variasi suhu yang digunakan adalah 30, 37, 40, 45°C

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian sebagai berikut:

1. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah dalam memanfaatkan limbah padi yaitu bekatul sebagai substrat pertumbuhan bakteri dalam memproduksi enzim protease sehingga bermanfaat untuk berbagai industri.
2. Memberikan informasi pH dan suhu optimum terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri proteolitik *indigenous* bekatul

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bekatul

2.1.1 Pengertian Bekatul

Bekatul merupakan bagian terluar bulir beras yang terbuang selama proses penyosohan beras (Thahir, 2010). Beras (*Oryza sativa*) menjadi salah satu makanan pokok utama bagi hampir setengah populasi penduduk di dunia, termasuk merupakan makanan pokok bagi penduduk Indonesia (Lestari dkk, 2014). Bekatul berasal dari proses penyosohan beras yang berasal dari gabah padi. Gabah padi pada dasarnya terdiri dari 2 bagian yaitu endosperma atau butiran beras dan kulit kulit padi (sekam). Kulit padi memiliki 2 lapisan, yaitu *hull* (lapisan luar) dan *bran* (lapisan dalam). Penggilingan padi bertujuan memisahkan beras dengan sekam yang kemudian dilakukan proses penyosohan dua kali. Penyosohan I menghasilkan dedak dengan tekstur kasar karena masih mengandung sekam dan penyosohan II menghasilkan bekatul (*rice bran*) yang bertekstur halus dan tidak mengandung sekam (Auliana, 2018). Penggilingan padi secara ideal akan menghasilkan 20% sekam dan 8–12% bekatul tergantung pada derajat penggilingan, serta 68–72% beras sosoh tergantung pada varietas (Farrel dan Hutton, 1990).

2.1.2 Morfologi dan Sifat Bekatul

Secara morfologi bekatul terdiri atas lapisan perikarp, testa dan, lapisan aleuron (Astawan dan Leomitro, 2009). Bekatul beras berwarna

terang, bercita rasa manis, agak berminyak, dan mempunyai sedikit flavor kacang panggang (Astawan dan Febrinda, 2010).



Gambar 2.1. Bekatul (Auliana, 2018)

Bekatul mempunyai tekstur yang beragam (halus, mirip tepung, atau berupa kepingan) tergantung dari proses stabilisasi yang dilakukan. Bekatul beras merupakan sumber serat pangan (25-35%), yaitu hampir dua kali lebih banyak dibandingkan serat pangan pada dedak oat. Serat pangan tidak larut (*insoluble dietary fiber*) berfungsi sebagai *bulking agent*, sementara serat pangan larut (*soluble dietary fiber*) berfungsi untuk menurunkan kolesterol (Wise, 1989). Serat pangan larut dapat mempengaruhi sifat-sifat tekstur, pembentukan gel, ketebalan, dan emulsifikasi (Olson *et al.*, 1987). Bekatul beras memiliki serat tidak larut yang cukup banyak, sehingga memiliki kapasitas pengikatan air yang lebih baik (Astawan dan Febrinda, 2010).

2.1.3 Kandungan Kimia Bekatul

Bekatul mengandung sejumlah nutrisi seperti protein, lemak dan serat pangan serta sejumlah vitamin dan mineral. Kandungan protein bekatul lebih rendah dibandingkan telur dan protein hewani, tetapi lebih tinggi dari kedelai, jagung, dan terigu. Asam amino sebagai unsur penyusun protein pada bekatul juga lebih lengkap dibandingkan beras. Vitamin yang terkandung dalam bekatul yaitu vitamin B1, B2, B3, dan B6 yang dibutuhkan oleh berbagai fungsi syaraf dan juga

otot dan vitamin B15 yang berfungsi membantu pembentukan asam amino tertentu seperti metionin. Bekatul mengandung mineral kalsium dan magnesium, berguna untuk pertumbuhan tulang dan gigi (Auliana, 2018). Hal serupa dinyatakan oleh Astawan dan Febrinda (2010) bahwa bekatul kaya vitamin B kompleks dan mengandung komponen mineral seperti besi, aluminium, kalsium, magnesium, mangan, fosfor, dan seng.

Bekatul juga mengandung lemak tidak jenuh tinggi, lemak ini lebih aman dalam kaitannya dengan kolesterol sehingga aman dikonsumsi oleh penderita kolesterol dan penyakit jantung. Bekatul juga mengandung tokoferol dan tokotrienol yang berfungsi sebagai antioksidan yang bermanfaat dalam berbagai pencegahan penyakit termasuk penuaan dini (Auliana, 2018). Henderson dkk, (2012) menyatakan bahwa bekatul mengandung asam amino esensial, antara lain: triptofan, histidin, sistein, dan arginin. Jenis serat pangan terdiri atas selulosa, hemiselulosa, pektin, arabinosilan, lignin, dan N-glukan. Selain itu, bekatul juga mengandung beberapa komponen bioaktif, seperti γ -oryzanol, asam ferulat, asam kafeat, tricine, asam kumarat, asam fitat, isoform vitamin E (α -tokoferol, tokoferol, tokotrienol), fitosterol (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol), dan karotenoid (α -karoten, β -karoten, lutein, likopen). Berbeda dengan sereal, seperti jagung, gandum, dan oat, fraksi lipid bekatul beras mengandung rasio isoform vitamin E, γ -oryzanol, dan β -sitosterol yang unik. Damayanti dkk (2007) menyebutkan bahwa komposisi kimia bekatul bervariasi tergantung pada varietas padi, lingkungan tanam padi, derajat penggilingan gabah, dan kontaminasi sekam pada proses penggilingan.

2.1.4 Manfaat Bekatul

Komponen bioaktif dan serat pangan yang terkandung di dalam bekatul menjadikan bekatul mempunyai peran sebagai sumber pangan fungsional. Hal ini sebagaimana dinyatakan oleh Astawan dan Febrinda (2010) bahwa kandungan gizi dan karakteristik fungsional yang dimiliki dedak dan bekatul beras merupakan potensi untuk pemanfaatan keduanya sebagai pangan fungsional dan *food ingredient*. Namun pengembangannya masih belum terlihat di masyarakat Indonesia. Pemanfaatan bekatul sebagai produk pangan di Indonesia masih sangat terbatas, misalnya sebagai makanan tradisional bubur atau jenang bekatul dan bangket bekatul. Di Indonesia, bekatul lebih banyak digunakan sebagai pakan ternak. Bekatul terkadang juga menjadi limbah yang mencemari lingkungan, terutama di sentra produksi padi saat panen musim penghujan (Widowati, 2001). Beberapa negara lain di dunia, seperti Amerika Serikat dan Jepang, yang sudah banyak mengembangkan bekatul sebagai produk pangan, misalnya sebagai sereal sarapan dan minyak bekatul (*rice bran oil*) (Tuarita dkk, 2017). Auliana (2018) menyatakan bahwa bekatul dapat digunakan sebagai antioksidan dengan zat bioaktif berupa oryzanol, tokoferol dan asam ferulat sehingga mampu menghambat kejadian kencing manis, penyakit Alzheimer, mencegah kejadian penyakit jantung dan kanker. Bekatul menurunkan 51% resiko kanker adenoma di saluran usus dan dapat menurunkan kadar trigliserida serum.

2.2 Bakteri Proteolitik

Bakteri *indigenus* merupakan bakteri bebas yang dapat mensintesis senyawa nitrogen, gula, dan substansi bioaktif lainnya. Metabolit yang diproduksi dapat diserap secara langsung oleh tanaman dan tersedia sebagai substrat untuk

perkembang biakan mikroorganisme yang menguntungkan. Fungsi mikroorganisme tersebut diantaranya: penambat nitrogen, pelarut fosfat, dan mikroba pendegradasi selulosa (Nia, 2010)

2.2.1 Jenis-jenis Bakteri Proteolitik

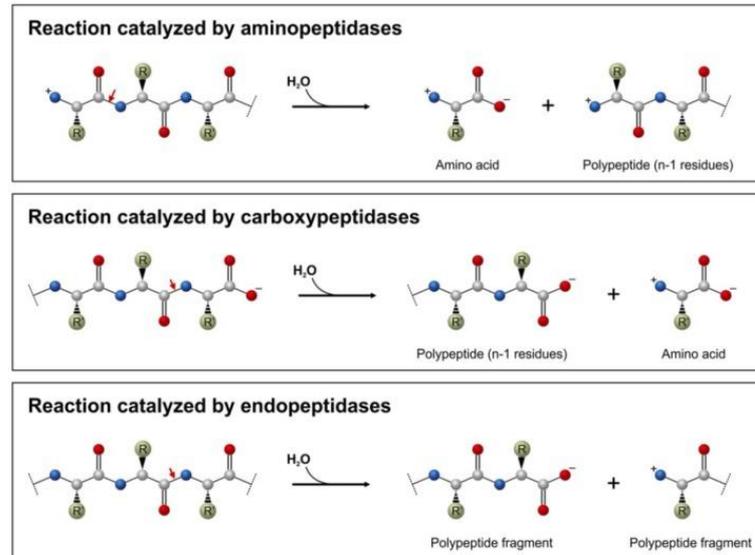
Bakteri yang tergolong proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim proteinase ekstraseluler yaitu enzim yang memecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar sel. Semua bakteri mempunyai enzim proteinase di dalam sel tetapi tidak semua mempunyai enzim proteinase ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok yaitu (Fardiaz dkk, 1992):

1. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora, misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*.
2. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora, misalnya *Bacillus*.
3. Bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya sebagian spesies *Clostridium*.

Beberapa bakteri bersifat putrefaktif yaitu memecah protein secara anaerobik dan memproduksi komponen-komponen yang berbau busuk seperti hidrogen sulfida, merkaptan, amin, indol, skatol, dan asam-asam lemak. Bakteri yang bersifat putrefaktif kebanyakan spesies *Clostridium* dan beberapa di antaranya adalah spesies *proteus*, *pseudomonas*, dan bakteri tidak berspora lainnya (Asriadiawaluddin, 2016).

2.2.2 Mekanisme Kerja Protease

Enzim proteolitik diklasifikasikan di bawah kategori enzim hidrolase. Ada kriteria lain, juga, dimana enzim proteolitik diklasifikasikan secara luas, protease dapat dikelompokkan sebagai eksopeptidase atau endopeptidase tergantung pada lokasi aksi. Eksopeptidase memecah ikatan peptida di dekat ujung rantai polipeptida. Eksopeptidase yang memotong ikatan dari terminal N dan menghasilkan residu asam amino tunggal atau di- atau tripeptida disebut sebagai aminopeptidase. Eksopeptidase yang bekerja pada terminal-C dan menghasilkan residu asam amino tunggal atau dipeptida disebut sebagai karboksipeptidase. Endopeptidase memisahkan ikatan dari termini. Enzim proteolitik diklasifikasikan menurut mekanisme kerja berdasarkan residu asam amino katalitik yang terlibat, dalam empat kategori: (1) serin protease, (2) protease aspartat, (3) protease sistein, dan (4) metalloproteases. Protein serin dapat berupa eksopeptidase atau endopeptidase sesuai dengan mode kerjanya dan aktif pada pH netral dan basa; seperti, subtilisin, komponen deterjen yang penting, diklasifikasikan sebagai serin protease. Protein aspartik adalah eksopeptidase aktif pada pH asam; seperti *chymosin* digunakan dalam pembuatan keju. Protein sistein biasanya aktif pada pH netral dan sering membutuhkan adanya pengurangan agen. Papain adalah protease sistein yang terkenal. Metalloprotease memiliki persyaratan karakteristik kation divalen untuk aktivitasnya; misalnya, kolagenase yaitu metalloprotease. Keduanya aktif dalam pH basa atau asam (Dhillon *et al.*, 2018). Reaksi pemecahan ikatan peptida dijelaskan sebagai berikut (Motyan *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Reaksi pemecahan ikatan peptida (Motyan *et al.*, 2013)

Aminopeptidase dapat melepaskan asam amino tunggal, dipeptida (dipeptidyl peptidases) atau tripeptida (tripeptidyl peptidases) dari ujung terminal N pada substratnya. Asam amino tunggal dapat dilepaskan dari substrat dipeptida oleh dipeptidase atau dari polipeptida oleh karboksipeptidase, sementara peptidil dipeptidase melepaskan dipeptida dari ujung terminal C dari rantai polipeptida. Endopeptidase memecah ikatan peptida di dalam dan jauh dari ujung rantai polipeptida. Aksi aminopeptidase dan karboksipeptidase melepaskan residu asam amino terminal sama seperti endopeptidase pada substrat polipeptida (memiliki n residu). Berdasarkan mekanisme katalitik dan adanya residu asam amino di lokasi aktif, protease dapat dikelompokkan sebagai protease aspartik, protease sistein, protease glutamat, metalloprotease, protease asparagin, protease serin, proteon treon, dan protease dengan campuran atau mekanisme katalitik tidak diketahui (Motyan *et al.*, 2013).

2.3 Protease

2.3.1 Enzim Protease

Semua enzim dianggap sebagai katalis di alam. Sebagian besar enzim diproduksi oleh fermentasi mikroorganisme (Ali dan Muhammad, 2017). Protease adalah enzim proteolitik (*protein-digesting*) yang terutama diklasifikasikan berdasarkan pH optimumnya sebagai protease asam, netral, dan alkali (Sumantha *et al.*, 2006). Protease dari mikroba merupakan enzim konstitutif atau inducibel parsial. Enzim konstitutif selalu tersedia di dalam sel mikroba konstitutif atau inducibel parsial. Enzim konstitutif selalu tersedia di dalam sel mikroba, Protease dari mikroba merupakan enzim konstitutif atau inducibel parsial. Enzim konstitutif selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif disintesis bila ada induksi substrat dalam medium. Sintesis enzim induktif meningkat seiring peningkatan konsentrasi substrat terutama bila substratnya merupakan satu-satunya sumber karbon (Badriyah dan Tri Ardyati, 2013). Protease adalah enzim proteolitik yang mengkatalisis hidrolisis protein menjadi asam amino dan peptida yang lebih kecil.

Keberadaan enzim merupakan sebuah fenomena alam yang menunjukkan kebesaran Allah SWT bagi manusia yang mau berpikir. Dalam surat Al-Baqarah ayat 164, Allah berfirman:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَآخْتِلَافِ 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 صُلًى وَتَصْرِيفِ الرِّيْحِ وَالسَّحَابِ الْمُسَخَّرِ بَيْنَ السَّمَاءِ وَالْأَرْضِ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang, Bahtera yang berlayar di laut membawa apa yang berguna bagi manusia, dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air, lalu dengan air dia*

hidupkan 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 kebsaran Allah) bagi kaum yang memikirkan” (Qs. Al-Baqarah: 164).

Tanda-tanda kebesaran Allah juga di jelaskan dalam Al-Qur’an surat Al-Hijr ayat 20 yang berbunyi:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعَايِشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ <٢٠>

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

Kedua ayat tersebut menjelaskan bahwa segala sesuatu yang Allah SWT datangkan ke bumi merupakan suatu pembuktian keberadaan sang Pencipta. Berdasarkan ayat di atas, Allah telah menyediakan segala sesuatu salah satunya adalah enzim untuk meringankan beban manusia dalam memenuhi kebutuhan hidupnya.

2.3.2 Klasifikasi Protease

Protease dinamakan peptida hidrolase dan merupakan kelompok besar protein, dipisahkan menjadi endopeptidase dan exopeptidase yang kemudian dikategorikan ke dalam serin protease, protease aspartik, protease sistein, aspartat, dan metalloprotease yang didasarkan pada mekanisme katalitiknya. Protease juga dapat dikarakterisasi berdasarkan pH yang memiliki hubungan yang lebih tinggi yaitu alkali (pH 8 hingga 13), asam (pH 2 sampai 6), dan netral (pH 6 sampai 8) (Ali dan Muhammad, 2017).

Protease (juga dikenal sebagai proteinase atau peptidase) adalah enzim proteolitik yang terlibat dalam katabolisme protein oleh hidrolisis ikatan peptida dalam protein atau polipeptida. Klasifikasi protein berdasarkan sumber organisme adalah hewan, tumbuhan dan, mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Beberapa sumber hewan, tumbuhan, dan bakteri dari protease tercantum dalam Tabel 2.1. Klasifikasi protein oleh mekanisme

proteolitik adalah serine protease, treonine protease, protease asam glutamat, protease sistein, protease aspartik dan metalloprotease (Tabel 2.2).

Tabel 2.1 Sumber Enzim Protease

| Organisme | Enzim |
|------------------|-------------------------------|
| Hewan | Chymotrypsin, tripsin, pepsin |
| Tumbuhan | Ficin, papain, bromelain |
| Bakteri | Bacillopeptidase, subtilisin |
| Jamur | Aspergillopepsin |

Sumber: Ali dan Muhammad (2017)

Tabel 2.2 Klasifikasi Protease

| Protease dengan mekanisme proteolitik | PH optimal | Kekhususan ikatan peptida | |
|--|-------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Serin protease | Asam protease | Endopeptidase | Exopeptidases |
| Threonine protease | Protease netral | Protease serin | Aminopeptidase |
| Protease sistein | Protease alkalin | Protease sistein | Dipeptidyl dipeptidases |
| Protease aspartat | | Protease aspartat | Karboksi peptidase |
| Metalloprotease | | Metalloprotease | Dipeptidase |
| Protease asam glutamat | | | |

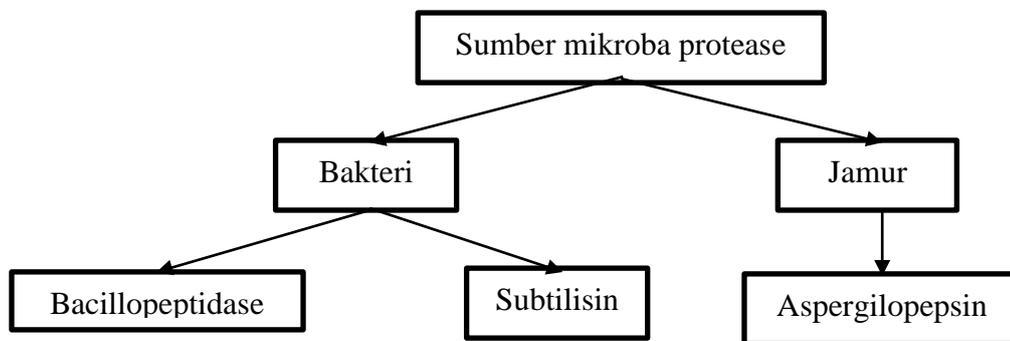
Sumber: Ali dan Muhammad (2017)

Klasifikasi protease berdasarkan pH optimal adalah protease asam, protease netral, dan protease alkali seperti ditunjukkan pada Tabel 2.1. Klasifikasi protease berdasarkan kekhususan ikatan peptida adalah Endopeptidase dan Exopeptidase. Exopeptidase adalah membelah substrat pada amino atau karboksil terminus yang masing-masing adalah N atau C, yaitu Aminopeptidases, Dipeptidil peptidases, Dipeptidases dan karboksi peptidases. Di sisi lain, Endopeptidase terputus dari ikatan peptida internal yaitu protease aspartik, protease serin, protease sistein, dan metalloprotease, ditunjukkan pada Tabel 2.1. Enzim serase protease dicirikan oleh residu serin di situs aktifnya. Protein serin banyak ditemukan di antara eukariota, virus, dan bakteri yang sangat penting bagi semua organisme. Enzim protease serin hadir dalam kelompok endopeptidase, exopeptidase,

omega peptidase, dan oligopeptidase. Serine protease memiliki kemampuan untuk menghambat secara ireversibel oleh Tosyl-L-lysine chloromethyle ketone (TLCK), diisopropyl flouro phosphate (DFP) dan fenil metil sulfonil (PMSF). Enzim protease serin khusus menunjukkan aktivitas optimal pada kisaran pH netral dan alkali dari 7 hingga 11 (Ali dan Muhammad, 2017).

2.3.3 Sumber Protease

Protease terjadi secara alami di semua organisme hidup. Pertumbuhan dan perkembangan di semua organisme terjadi sebagai hasil dari keseimbangan keseluruhan antara sintesis protein dan proteolisis. Secara komersial, enzim proteolitik dari sumber tanaman telah mendapat perhatian khusus karena spesifisitas substratnya yang luas serta aktivitas dalam kisaran pH dan suhu yang luas (Vidyalakshmi dan Selvi, 2013). Skema sumber protease dilaporkan oleh Ali dan Muhammad (2017) yang dipaparkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Skema Mikroba Protease (Ali dan Muhammad, 2017)

Protease dari bakteri dan jamur dihasilkan terutama oleh fermentasi skala industri, beberapa dimodifikasi secara genetik. Protease yang dikenal dari sumber hewani adalah renin, tripsin, pepsin dan kimotripsin. Renin (kimosin) ditemukan di perut semua mamalia menyusui. Dengan aksi pepsin, renin dikonversi menjadi renin aktif. Renin banyak digunakan dalam industri susu untuk menghasilkan dadih dan keju. Renin

memotong glikopeptida terminal-C dan dalam kasein satu ikatan peptida yang menghasilkan para-k kasein yang merupakan bentuk tidak larut. Tripsin mengambil bagian dalam hidrolisis protein makanan. Tripsin adalah serin endopeptidase yang diproduksi oleh sel asinar pankreas. Tripsin diaktifkan setelah proteolisis tripsinogen yang memotong peptida pada terminal karboksil dari rantai samping lisin dan arginin yang bermuatan positif. Tripsin digunakan untuk persiapan media bakteri dan beberapa aplikasi medis khusus. Pepsin adalah protease aspartik yang diperoleh dari lapisan kelenjar lambung. Pepsin diaktifkan oleh pepsinogen. Pepsin memiliki dua residu asam aspartat di lokasi aktif, dan menunjukkan aktivitas optimal pada pH 1 dan 2, karena pH optimal lambung adalah 2 - 4. Kimotripsin juga merupakan endopeptidase serin dan diproduksi oleh sel pankreas. Kimotripsin diaktifkan oleh kimotripsinogen oleh tripsin yang memecah ikatan peptida pada sisi karboksil tirosin, triptopan, fenilalanin, dan metionin. Proses tersebut juga dapat mengkatalisis hidrolisis ikatan ester. Kimotripsin digunakan dalam persiapan obat. Selama operasi katarak, kimotripsin kadang-kadang digunakan untuk mengurangi kerusakan pada mata. Protease asal tanaman adalah papain, bromalin keratinase, dan fisin. (Ali dan Muhammad, 2017).

Protease mikroba lebih disukai daripada yang lain untuk pembuatan dalam skala luas karena pertumbuhannya yang sangat cepat dan kemudahan hidup bagi generasi enzim rekombinan baru dengan sifat-sifat yang disukai. Mikroorganisme mewakili bagian dua pertiga dari penciptaan protease bisnis di sektor bisnis majemuk di dunia (Ali dan Muhammad, 2017).

2.3.4 Kegunaan Protease

Protease banyak digunakan sebagai biokatalis di industri seperti tekstil, binatu, perawatan kesehatan, dll. Protease netral terutama digunakan dalam pemrosesan makanan seperti memanggang, menyeduh, dan juga di sektor

kesehatan. Salah satu aplikasi yang lebih baru dari protease adalah mengeksploitasi sifatnya yang ramah lingkungan dan dapat digunakan untuk ekstraksi minyak nabati sehingga protease digunakan sebagai alat bantu pengolahan makanan. Protease juga dapat mengganti pelarut organik berbahaya seperti heksana (Sumantha dkk., 2006).

Protease memiliki peran yang sangat penting dalam banyak proses patologis dan fisiologis. Protease yang bersifat intraseluler memiliki peran besar dalam proses metabolisme dan seluler, misalnya pergantian protein, pematangan hormon, dan enzim serta mempertahankan kumpulan protein (Ali dan Muhammad, 2017). Protease efektif dalam menghilangkan jaringan yang rusak dan terinfeksi dari luka dan dengan demikian memainkan peran penting dalam proses penyembuhan luka. Enzim-enzim ini dapat digunakan untuk meluruhkan *adherent slough* dan *eschar*. Debridemen enzimatik adalah teknik utama dalam kasus-kasus tertentu ketika debridemen bedah tidak layak. Protease dari berbagai sumber seperti tumbuhan, mikroba, belatung, dan hewan ternyata bermanfaat dalam debridemen luka (Vidyalakshmi dan Selvi, 2013). Protease berperan penting dalam industri kulit, farmasi, deterjen, pertanian, dan makanan. Saat ini, estimasi yang dievaluasi dari penawaran katalis mekanik di seluruh dunia adalah lebih dari 3 miliar USD, di mana protease mewakili sekitar 60% dari penawaran agregat (Ali dan Muhammad, 2017).

2.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Kemampuan enzim dalam mempercepat reaksi dipengaruhi beberapa faktor yang menyebabkan enzim dapat bekerja dengan optimal dan efisien. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim protease adalah suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pengaruh inhibitor, dan activator (Sukmana, 2014):

1. Suhu

Suhu pada media fermentasi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh dalam produksi enzim. Enzim adalah suatu protein, kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi apabila melebihi suhu optimumnya, sehingga bagian aktif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya akan menurun (Poedjadi dan Supriyati, 2006).

Suhu memainkan peranan penting dalam reaksi enzimatik. Ketika suhu bertambah sampai mencapai suhu optimum, kecepatan reaksi enzimatik naik karena energi kinetik bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak baik enzim maupun substrat. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat untuk bereaksi. Peningkatan suhu melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan di dalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada didalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1997).

2. pH

pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling efektif dalam mengikat substrat. Apabila konsentrasi hidrogen berubah dari konsentrasi optimalnya, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1993). Selain itu, pH rendah atau tinggi menyebabkan enzim terdenaturasi yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim (Poedjadi dan Supriyadi, 2006). Bila pH dibawah atau di atas pH optimum, semakin jauh dari

pH optimum maka enzim semakin tidak stabil dan semakin tinggi suhu maka stabilitasnya semakin menurun (Sumarlin, 2008).

3. Konsentrasi enzim

Sama halnya katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Peningkatan konsentrasi lebih lanjut memiliki efek samping berpengaruh pada produksi enzim. (Poedjadi dan Supriyanti, 2006)

4. Konsentrasi substrat

Pada konsentrasi rendah, bagian aktif enzim menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, semakin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada bagian aktif tersebut. Dengan demikian konsentrasi kompleks enzim substrat semakin besar dan hal ini menyebabkan semakin besar kecepatan reaksi. Pada batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat. Dalam hal ini, bertambah besarnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi kompleks enzim tersebut, sehingga jumlah hasil reaksinya pun tidak bertambah besar (Poedjadi dan Supriyanti, 2006). Produksi enzim akan meningkat dengan seiring bertambahnya konsentrasi substrat, namun peningkatan konsentrasi lebih lanjut memiliki efek samping berpengaruh pada produksi enzim (Gomma, 2013).

5. Pengaruh Inhibitor dan Aktivator

Kerja enzim dapat terhalang oleh zat lain. Zat yang dapat menghambat kerja enzim disebut inhibitor. Ketika inhibitor berikatan dengan enzim maka akan menyebabkan penurunan kecepatan reaksi enzimatik. Zat penghambat atau

inhibitor dapat menghambat kerja enzim untuk sementara atau secara tetap. Inhibitor enzim dibagi menjadi dua, yaitu inhibitor reversible dan inhibitor ireversibel (Poedjadi dan Supriyanti, 2006).

2.5 Penentuan Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan U (unit) per mL. satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013). Aktivitas protease diukur dengan menggunakan metode Bregmeyer (1983). Prinsip kerja pengukuran aktivitas protease dengan metode ini adalah hidrolisis substrat oleh protease menjadi peptida dan asam amino dengan bantuan air, substrat yang digunakan adalah kasein (Sumarlin, 2008). Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium kaseinat. Dalam Al'qur'an surat Adz-Zariyaat [51]:49 bahwa Allah menciptakan segala sesuatu yang ada dimuka bumi ini berpasang-pasangan. Seperti Allah menciptakan laki-laki dan perempuan. Begitu pula enzim diciptakan berpasangan dengan substrat. Enzim memiliki spesifitas atau kekhasan terhadap substrat (Pleazar dan Chan, 1998).

Enzim protease merupakan enzim yang berperan dalam 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 dapat dijadikan tolak ukur aktivitas katalisis protease. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease, harus dipisahkan dari substrat yang belum terhidrolisis dengan menggunakan TCA (*Trichloro Acetic Acid*). Produk yang mengandung peptida dan

asam amino akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang memiliki bobot molekul yang besar atau protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap. Penambahan TCA juga berfungsi menginaktifkan enzim protease dan menghentikan waktu inkubasi. Tahap pemisahan peptide dan asam amino yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang mengendap dibantu dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Supernatant yang terbentuk melalui tahap pemisahan merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease. Asam amino tirosin dan tryptophan yang larut dalam TCA akan bereaksi dengan reagen folin dan menghasilkan warna biru. Larutan dibaca pada panjang gelombang 578 nm dengan spectrometer Uv-Vis. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi asam amino yang terbentuk (Sumarlin, 2008).

BAB III

METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-Juli 2020 dan bertempat di Laboratorium Biokimia 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, timbangan analitik, spatula, laminar, seperangkat alat gelas, pipet ukur, bola hisap, *hot plate*, *autoklaf*, kawat ose, shaker, *vortex*, *spectrophotometer* UV-Vis, sentrifugasi, kertas sampul, plastik WRAP, kantong plastik tahan panas, sterer, botol semprot, rak tabung, bunsen dan korek api.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan lain yang digunakan adalah dalam penelitian ini adalah isolat bakteri proteolitik, susu skim, Aquades, Alkohol 70 % untuk desinfektan, alumunium foil, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2CO_3 , Pepton, KH_2PO_4 , Glukosa, kertas label, tissue, kapas, tirosin, buffer fosfat pH 6, 7, 8, 9, asam trichloroasetat (TCA), reagen Folin.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara kuantitatif untuk mengetahui bagaimana kondisi optimum produksi enzim protease yang dihasilkan isolat bakteri proteolitik dengan menggunakan variasi pH dan suhu. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

a. Faktor pertama : pH (P)

P1 : pH 6

P2 : pH 7

P3 : pH 8

P4 : pH 9

b. Faktor kedua : suhu (T)

T1 : 30°C

T2 : 37°C

T3 : 40°C

T4 : 45°C

Berdasarkan kedua faktor tersebut diperoleh kombinasi perlakuan, sebagai berikut :

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan suhu dan pH

| pH (P) \ Suhu (T) | (P1) | (P2) | (P3) | (P4) |
|-------------------|------|------|------|------|
| (T1) | P1T1 | P2T1 | P3T1 | P4T1 |
| (T2) | P1T2 | P2T2 | P3T2 | P4T2 |
| (T3) | P1T3 | P2T3 | P3T3 | P4T3 |
| (T4) | P1T4 | P2T4 | P3T4 | P4T4 |

3.4 Tahapan Penelitian

1. Tahap preparasi alat dan bahan.
2. Pembuatan Media.
 - a. Media *Nutrien Agar* (untuk peremajaan isolat)
 - b. Pembuatan media *spesifik Borth* (untuk produksi enzim).
3. Peremajaan isolat
4. Pembuatan kurva standar tirosin
5. Produksi enzim protease dari bakteri proteolitik
6. Uji aktivitas bakteri proteolitik dengan variasi suhu yaitu 30, 37, 40, 45°C.
dan pH 6, 7, 8, 9
7. Analisis data.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan cara membungkus alat-alat (hanya alat yang bisa dibungkus) dengan aluminium foil, kertas dan kemudian dimasukkan ke dalam plastik wrab. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan

dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Adapun bahan (bekatul) yang telah didapat dari penggilingan padi di Malang dan disimpan ditempat yang kering untuk proses selanjutnya (Produksi Protease).

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Media Nutrient Agar (NA)

Ditimbang ditimbang 2,8 gram nutrient agar. Kemudian dilarutkan kedalam 100 ml Aquade. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dipanaskan hingga larut sempurna dan di *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

3.5.2.2 Media Spesifik Borth

Ditimbang 0,375 gram pepton, 0,25 gram glukosa, 0,25 gram KH_2PO_4 , 0,25 gram MgSO_4 dan dilarutkan dalam 50 ml aquades . Kemudian dipanaskan hingga larut sempurna dan di *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.3 Peremajaan Isolat

Isolat bakteri proteolitik diremajakan pada media NA miring dengan cara menggoreskan satu ose isolate bakteri dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

3.5.4 Pembuatan Kurva Standar 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.

3.5.5 Produksi Enzim Protease dari Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri proteolitik-K diinokulasikan sebanyak 2 ose dalam 50 mL media pertumbuhan media *Spesifik Borth* (0,375 gram pepton, 0,25 gram glukosa, 0,25 gram KH_2PO_4 , dan 0,25 gram $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm selama 18 jam. Inokulum kemudian diambil sebanyak 5 mL kemudian dipindahkan dalam 50 ml media *Spesifik Broth* dan diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 37°C selama 22 jam. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C (Apriyantono *et al.*, 1989). Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim dan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

3.5.6 Uji Aktivitas Bakteri Proteolitik dengan Variasi pH dan Suhu (Elidar dan Nunuk, 2002)

Aktivitas protease diukur dengan mereaksikan 0,5 mL larutan enzim ditambahkan dengan 1 mL 0,05 M larutan buffer fosfat pH 6, 7, 8, dan 9 kemudian ditambahkan susu skim 1%. Kemudian diinkubasikan dalam *water bath* pada suhu 30, 37, 40, dan 45 °C selama 15 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

3.5.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap besarnya nilai aktivitas Protease, digunakan rancangan penelitian berupa rancangan acak lengkap (RAL) pola factorial. Data variasi suhu dan pH terhadap aktivitas protease dianalisis untuk mengetahui apakah berpengaruh nyata atau tidak terhadap uji statistik two way ANOVA.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Produksi Protease dari Bakteri Proteolitik

Produksi enzim protease dilakukan dengan menggunakan isolat-K hasil isolasi dari bekatul yang dilakukan oleh Umayyah (2019). Dilakukan peremajaan bakteri proteolitik terlebih dahulu sebelum dilakukannya produksi enzim protease. Peremajaan bakteri proteolitik dilakukan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring sebagai media pertumbuhannya, media ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri, dimana semua unsur ini dalam bentuk persenyawaan (Irianto, 2007). Peremajaan isolat bertujuan untuk meregenerasi atau memperbarui sel bakteri, menjaga ketersediaan nutrisi dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari kultur murni yang ditanam. Peremajaan isolat dilakukan dengan cara menggoreskan pada media miring secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Inkubasi dilakukan pada selang waktu 24 jam karena pada selang waktu tersebut bakteri diasumsikan telah mengalami fase logaritmik atau eksponensial yang ditandai dengan meningkatnya jumlah sel sehingga bakteri siap dipanen (Dwijoseputro, 1994).

Media produksi untuk menghasilkan enzim harus memenuhi kebutuhan dasar untuk menghasilkan sel serta produk. Unsur yang paling utama dibutuhkan adalah nitrogen dan karbon. Nitrogen sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan sel dan karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis (Aunstrup, 1979). Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan, kebutuhan untuk hidup, dan tumbuh berkembang. Media produksi yang

digunakan pada penelitian ini adalah media spesifik Borth yang mengandung (0,375 gr pepton, 0,25 gr glukosa, 0,25 gr KH_2PO_2 , dan 0,25 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

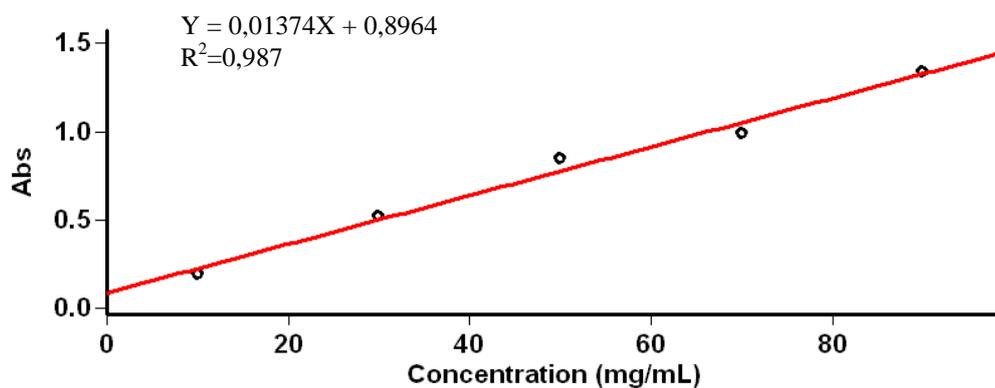
Bakteri proteolitik merupakan mikroorganisme yang memproduksi enzim protease yang termasuk enzim ekstraseluler, sehingga enzim protease dapat diekstrak melalui dinding sel dengan cara sentrifugasi. Fungsi utama enzim ekstraseluler ini adalah mengubah nutrient disekitar sel dan membawanya masuk ke dalam sel sebagai energi untuk pertumbuhan sel (Aulanni'am, 2005). Pembuatan inokulum diinkubasi selama 18 jam. Ekstrak kasar protease diperoleh dengan mensentrifugasi kultur bakteri dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan sel-sel mikroorganisme yang mengendap dan supernatan yang merupakan cairan yang berisi enzim. Dalam teknik sentrifugasi pemilihan kecepatan dan gaya berat harus diperhatikan untuk memisahkan supernatan dari selnya (Rahayu, 1990). Sentifugasi dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah terjadinya kerusakan struktur enzim (Baehaki, 2008). Supernatan (ekstrak kasar) yang diperoleh kemudian digunakan untuk uji aktivitas enzim protease.

4.2 Uji Aktivitas Protease Secara Kualitatif

4.2.1 Kurva Standar Tirosin

Aktivitas protease diukur dengan menggunakan 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. Pengukuran aktivitas protease diperoleh berdasarkan kurva larutan standar tirosin. Kurva larutan standar tirosin diperoleh

dengan mengukur absorbansi dari larutan standar tirosin pada beberapa konsentrasi yaitu 10, 30, 50, 70 dan 90 mg/L pada panjang gelombang maksimum sebesar 747,9 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data absorbansi larutan standar tirosin disajikan dalam bentuk grafik antara konsentrasi larutan dengan absorbansinya disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Kurva Larutan Standar Tirosin

Kurva larutan standar yang diperoleh antara konsentrasi tirosin dan absorbansinya menghasilkan persamaan garis linier yaitu $Y = 0,01374 X + 0,8964$, dimana Y merupakan absorbansi dan X merupakan konsentrasi larutan tirosin. Kurva larutan standar tersebut menghasilkan koefisien korelasi R^2 sebesar 0,987 berada pada rentang $0,9 < R^2 < 1$ yang menunjukkan adanya korelasi yang baik dan linearitas yang baik antara konsentrasi larutan tirosin dengan absorbansinya (Harisman dan Sugiarto, 2014). Koefisien regresi sebesar 0,01374 bernilai positif menunjukkan bahwa kurva standar larutan tirosin yang diperoleh mempunyai korelasi linear positif. Hal ini sesuai dengan Hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi larutan standar semakin besar absorbansinya (Lesnussa *et al.*, 2019). Konsentrasi tirosin di dalam sampel dapat

diketahui dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam nilai y (Harisman dan Sugiarto, 2014).

4.2.2 Uji Aktivitas Protease

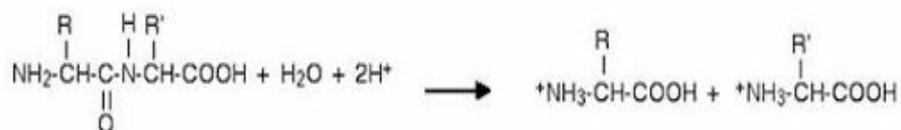
Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptide rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti, 2002). Proses pemecahan ikatan peptida menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana oleh enzim protease disebut aktivitas proteolitik. Aktivitas enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia, yaitu dengan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut, dan secara kuantitatif diukur dengan laju reaksinya. Aktivitas enzim protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013).

Suatu bioproses untuk memproduksi enzim memerlukan beberapa faktor, diantaranya yaitu; jenis mikroba, kurva pertumbuhan, dan kondisi optimum untuk meningkatkan aktivitas enzim (Fardiaz, 1998). Degradasi protein dapat terjadi salah satunya karena adanya aktivitas enzim protease. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan variasi suhu dan pH, untuk memperoleh suhu dan pH optimum (Yusriah dan Nengah, 2013). Aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan metode (Elidar dan Nunuk, 2002). Prinsip kerja metode ini adalah pengukuran asam amino tirosin yang terhidrolisis dari substratnya. Enzim akan menghidrolisis substrat kasein dengan bantuan air menjadi asam amino dan peptida (Suhartono, 1992). Pada penelitian ini substrat yang digunakan adalah kasein (susu skim).

Kasein adalah protein yang paling banyak tersedia dalam susu dengan proporsi sekitar 80%. kandungan protein utama dalam susu skim adalah kasein mencapai 3,7% (Buckle et al. 1987). Susu skim mengandung kasein yang digunakan sebagai substrat enzim. Kasein merupakan protein susu yang terdiri atas fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium kalseinat. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protein. Protease mengkatalisis degradasi kasein yaitu dengan memutuskan ikatan peptide CO-NH dengan masuknya air kedalam molekul (Susanti, 2002). Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease, dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan asam trikloroasetat (TCA). Asam amino dan peptide akan dilarutkan dengan TCA, sedangkan untuk protein yang memiliki bobot molekul yang paling besar akan mengendap. Selain itu TCA juga berfungsi menginaktifkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease (menghentikan reaksi enzimatis). Tahap pemisahan asam amino dan peptide yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis dibantu dengan cara mensentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit supernatant yang terbentuk melalui tahap pemisahan tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease (Yusriah dan Nengah, 2013).

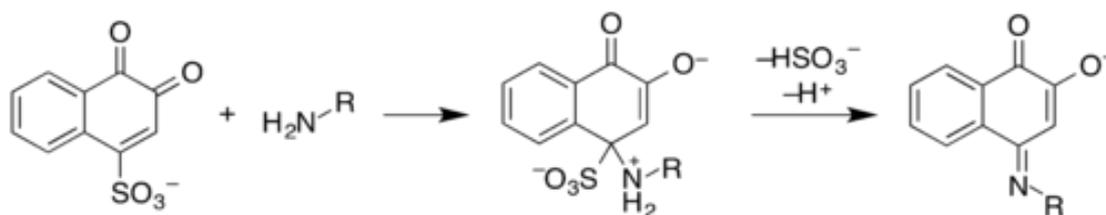
Filtrat dan endapan yang terbentuk dipisahkan dengan cara sentrifugasi. penambahan Na_2CO_3 0,5 M yang dapat mengikat air didalam larutan. Folin-Ciocalteu digunakan sebagai reagen pewarna yang bereaksi dengan protein membentuk warna biru. Prinsip metode Folin-Ciocalteu adalah oksidasi gugus fenolik hidroksil. Pereaksi ini mengoksidasi gugus fenolat (garam alkali),

mereduksi asam hetero poli 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 (4.2) Reaksi Hidrolisis Kasein (Ikatan Peptida) Menjadi Asam

Amino



3,4-dioxo-3,4-dihydronaphthalene-2-olate sulfonate

4-mono-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-1-sulfonate

Gambar (4.3) Reaksi antara Folin-Ciocalteu dengan Asam Amino (Saurina dan Hernandez-Cassou, 1994).

Hasil dari reaksi gambar (4.3) merupakan senyawa 3,4-dioxo-3,4-dihydronaphthalene-1-sulfonate yang bereaksi dengan asam amino dan menghasilkan zat antara dan ion sulfat dan H^+ yang membentuk senyawa 4-mono-1-oxo-1,4-dihydronaphthalene-2-olate.

Intensitas warna yang terbentuk bergantung pada jumlah asam amino aromatik yang ada didalam larutan tersebut. Hal ini didasarkan pada hukum Lambert Beer yang menyatakan absorban berbanding lurus dengan dengan panjang lintasan tebal kuvet, dan konsentrasi (Rohman, 2007). Warna yang terbentuk kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 747,9 nm. Dalam uji aktivitas protease, tirosin digunakan untuk mengukur aktivitas protease. Semakin besar asam amino dihasilkan dari reaksi pemecahan protein tersebut maka dapat dikatakan bahwa protease tersebut memiliki aktivitas yang tinggi (Yusriah dan Kuswiyasari, 2013). Panjang gelombang 747,9 nm merupakan serapan dari fosfotungstat-fosfomolibdat. Pada penelitian ini, tirosin diukur secara kalorimetrik menggunakan reagen Folin Ciocalteu dimana terjadi reaksi oksidasi dan reduksi yang mana gugus fenolik-hidroksil pada tirosin bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat menghasilkan warna biru (Nizar et al., 2015).

4.2.3 Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Enzim Protease

Enzim protease pada penelitian ini diproduksi dari isolat *indigenous* bekatul dan diukur aktivitasnya pada berbagai variasi pH dan suhu perlakuan. Hasil variasi pH dan suhu serta interaksi antara pH dan suhu terhadap aktivitas enzim protease disajikan pada Tabel 4.1. kemudian aktivitas enzim protease dilakukan pengujian secara statistik menggunakan ANOVA. Hasil uji two way ANOVA disajikan pada tabel 4.2.

Tabel 4.1 Hasil two way ANOVA pengaruh pH dan suhu dan interaksi keduanya terhadap aktivitas enzim protease

| Sumber Keragaman | Db | JK | KT | F _{hitung} | F _{tabel 5%} | Sig. |
|------------------|----|--------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|--------|
| Perlakuan | 15 | 7,312 x10 ^{-5a} | 4,875 x10 ⁻⁶ | 1,634 | 1,99 | 0,119 |
| Ph | 3 | 2,280 x10 ⁻⁵ | 7,599 x10 ⁻⁶ | 2,547 | 2,90 | 0,073 |
| Suhu | 3 | 3,444 x10 ⁻⁵ | 1,148 x10 ⁻⁵ | 3,849* | 2,90 | 0,019* |
| pH*Suhu | 9 | 1,588 x10 ⁻⁵ | 1,764 x10 ⁻⁶ | 0,591 | 2,19 | 0,794 |
| Galat | 32 | 9,546 x10 ⁻⁵ | 2,983 x10 ⁻⁶ | | | |
| Total | 48 | 0,006 | | | | |

Keterangan:

db = Derajat Bebas, JK = Jumlah Kuadrat, KT=Kkuadrat Tengah, Sig. = Signifikansi

(a) R Squared = .434 (Adjusted R Squared = .168)

(*) F_{hitung} > F_{tabel 5%} artinya terdapat perbedaan nyata

(*) Sig < Sig 5% artinya terdapat perbedaan nyata

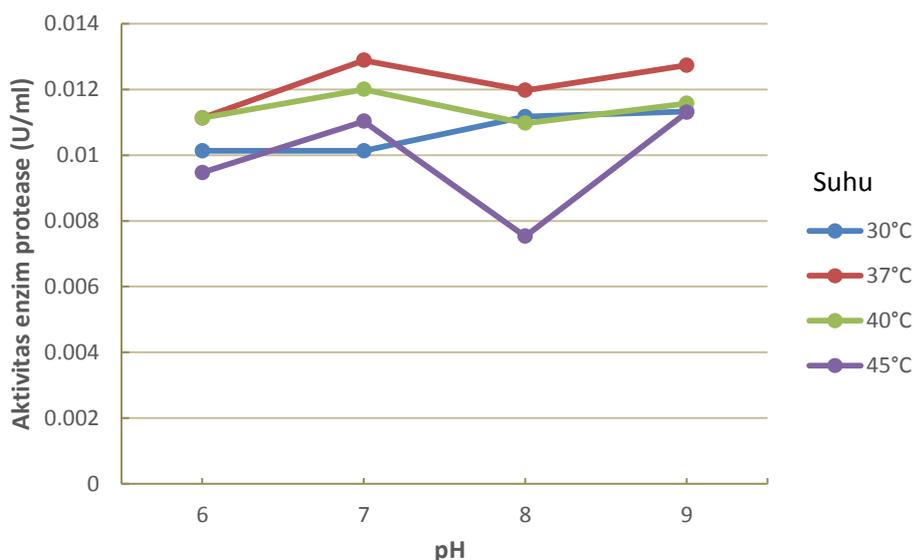
Hasil analisis statistik two way ANOVA pada Tabel 4.1, pada interaksi pH dan suhu dalam produksi enzim protease dari *indigenus* bekatul diperoleh nilai F_{hitung} (0,591) < F_{tabel 5%} (2,19) dan nilai sig 0,794 > 0,05, artinya interaksi pH dan suhu tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim protease dari *indigenus* bekatul. Pengujian beda nyata tiap perlakuan berdasarkan variasi suhu dan pH secara acak dalam produksi protease dilakukan dengan uji Duncan diperoleh pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Uji Duncan Interaksi pH dan Suhu terhadap Aktivitas Enzim Protease

| pH | Suhu | Aktivitas enzim (U/mL) | Notasi |
|----|------|------------------------|--------|
| 6 | 30°C | 0,01013 | a |
| | 37°C | 0,01113 | a |
| | 40°C | 0,01113 | a |
| | 45°C | 0,00947 | a |
| 7 | 30°C | 0,01163 | a |
| | 37°C | 0,01288 | a |
| | 40°C | 0,01200 | a |
| | 45°C | 0,01103 | a |
| 8 | 30°C | 0,01117 | a |
| | 37°C | 0,01197 | a |
| | 40°C | 0,01097 | a |
| | 45°C | 0,00753 | a |
| 9 | 30°C | 0,01133 | a |
| | 37°C | 0,01273 | a |
| | 40°C | 0,01157 | a |
| | 45°C | 0,01130 | a |

Keterangan: Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan nyata

Hasil uji Duncan interaksi antara pH dan suhu dalam produksi enzim protease dari *indigenous* bekatul menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata pada variasi pH dan suhu terhadap aktivitas enzim protease. Interaksi antara pH 6, 7, 8, dan 9 dengan suhu antara 30°C, 37°C, 40°C dan 45°C yang dikombinasikan secara acak tidak memberikan hasil aktivitas protease yang berbeda secara nyata. Pada dasarnya, enzim akan bekerja maksimal atau mempunyai aktivitas maksimal dan efisien jika berada pada kondisi yang optimum dan setiap enzim mempunyai kondisi optimum yang berbeda-beda (Sari, 2017). Kondisi optimum produksi enzim protease dari *indigenous* bekatul dapat ditunjukkan berdasarkan hasil aktivitas enzim protease yang disajikan pada Gambar 4.4 (dilampiran)



Gambar 4.4 Grafik Aktivitas Enzim Protease dari *Indigenous* Bekatul berdasarkan variasi pH dan Suhu

Pada pH 6, aktivitas enzim protease dari *indigenous* bekatul menunjukkan hasil yang lebih besar jika diproduksi pada suhu 37°C dan 40°C dibandingkan suhu 30°C dan 45°C. Penambahan nilai pH menjadi lebih basa yaitu pada pH 7, terjadi kenaikan aktivitas enzim protease yang dipanaskan pada seluruh variasi suhu 30°C, 37°C, 40°C, dan 45°C. Penambahan nilai pH menjadi lebih basa yaitu pada pH 8 terjadi penurunan aktivitas enzim protease yang diproduksi pada suhu 37°C, 40°C, dan 45°C, sedangkan pada suhu 30°C terjadi kenaikan aktivitas enzim protease. Penambahan nilai pH menjadi lebih basa yaitu pada pH 9 terjadi kenaikan aktivitas enzim protease pada seluruh suhu. Perubahan pH dan suhu diikuti dengan perubahan aktivitas enzim disebabkan karena perubahan konformasi dalam larutan. Menurut Rabelo *et al.* (2011) peningkatan pH dan suhu yang diikuti dengan penurunan aktivitas enzim disebabkan oleh perubahan konformasi enzim dalam larutan.

Aktivitas protease mencapai optimum dengan kondisi pH yang berbeda-beda. Protease adalah enzim proteolitik (*protein-digesting*) yang terutama diklasifikasikan berdasarkan pH optimumnya sebagai protease asam, netral, dan alkali (Sumantha *et al.*, 2006). Pada pH 7, aktivitas enzim protease mengalami peningkatan aktivitas karena adanya perubahan kondisi lingkungan dari asam menjadi netral. Perubahan pH tersebut menyebabkan perubahan konformasi enzim dalam larutan. Peningkatan aktivitas mengindikasikan bahwa pH netral memberikan konformasi yang sesuai dalam larutan untuk proses katalitis. Hal ini sebagaimana dinyatakan oleh Rabelo *et al.* (2011) bahwa perubahan pH menyebabkan perubahan aktivitas enzim disebabkan oleh perubahan konformasi enzim dalam larutan.

Peningkatan pH menjadi 8 menyebabkan adanya perubahan dimana OH^- meningkat sehingga meningkatkan muatan negatif enzim dan mengubah konformasi enzim. Menurunnya aktivitas enzim menunjukkan bahwa konformasi enzim pada pH 8 tidak kondusif dalam mengikat substrat dan belum tercapainya kestabilan enzim. Peningkatan kembali aktivitas protease dengan meningkatnya pH karena pada dasarnya belum terbentuk kestabilan konformasi enzim. Hal ini sebagaimana dinyatakan oleh Jakubowski (2010) bahwa kondisi pH lingkungan mempengaruhi kestabilan enzim, yaitu pada muatan listrik enzim. Kehadiran H^+ meningkatkan muatan positif enzim dan OH^- meningkatkan muatan negatif enzim. Pada satu titik muatan positif/ negatif enzim akan jenuh dengan meningkatnya H^+/OH^- . Enzim mengurangi kepadatan muatan berlebih dengan membuka sendiri, untuk mendapatkan lebih banyak stabilitas (Nuzulah dan Suharti, 2011).

Kondisi pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Ketika konsentrasi ion

hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, sehingga aktivitas protease rendah. Hal ini karena aktivitas enzim protease secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional pada pH yang tidak optimum. Aktivitas enzim yang menurun karena perubahan pH juga disebabkan oleh berubahnya keadaan ion substrat dan enzim. Perubahan tersebut dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kuartener enzim aktif (Yusriah dan Kuswytasari, 2013).

Pada suhu 30°C, peningkatan pH menjadi 8 semakin meningkatkan aktivitas protease. Hal ini pada dasarnya pH dan suhu sama-sama dapat mengubah konformasi enzim. Ketika interaksi pH dan suhu sesuai dengan konformasi enzim terhadap substratnya yang membuat reaksi katalitik menjadi semakin cepat membuat aktivitas protease semakin besar.

Berdasarkan suhu, diamati adanya peningkatan aktivitas protease seiring peningkatan suhu dari 30°C menjadi 37°C. Hasil menunjukkan bahwa pada suhu 30°C reaksi enzimatik berlangsung lambat dan kenaikan suhu menjadi 37°C dapat meningkatkan energi rata-rata dari molekul reaktan dan menurunkan energi aktivasi sehingga meningkatkan laju reaksi enzimatik protease. Hal ini sebagaimana dinyatakan oleh Garret (1999) bahwa pada suhu rendah, reaksi enzimatik berlangsung lambat, kenaikan suhu akan mempercepat reaksi dengan meningkatkan energi rata-rata molekul reaktan, menyebabkan energi aktivasi reaksi lebih rendah, sehingga meningkatkan laju reaksi sampai suhu optimum tercapai dan reaksi enzimatik mencapai maksimum.

Pada suhu lebih besar lagi yaitu 40°C dan 45°C terjadi penurunan kecepatan reaksi enzimatik dimana penurunan semakin besar seiring bertambahnya suhu.

Kondisi tersebut menunjukkan bahwa pada suhu 40°C telah terjadi denaturasi enzim protease. Kenaikan suhu melewati suhu optimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi dan menurunkan kecepatan reaksi enzimatik (Wuryanti, 2004). Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif protease akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan menurun (Balqis dan Fahrimal, 2011).

Pada suhu 40°C dan 45°C terjadi penurunan aktivitas enzim protease karena suhu lingkungan yang meningkat di sekitar enzim akan menyebabkan putusannya ikatan hidrogen, ikatan ion atau interaksi hidrofobik sehingga struktur tersier enzim berubah, yang menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaan sehingga sisi aktif enzim berubah mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas enzim (Whitaker, 1994). Rendahnya aktivitas enzim pada kedua suhu 40°C dan 45°C dibandingkan suhu optimum (37°C) disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia. Energi aktivasi dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik molekul enzim maupun molekul substrat.

Peningkatan energi molekul substrat akan meningkatkan laju reaksi enzim. Kenaikan suhu menyebabkan aktivitas enzim meningkat, karena suhu yang semakin tinggi akan meningkatkan energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi substrat, sehingga produk yang terbentuk semakin banyak. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan suhu mengakibatkan enzim mengalami denaturasi dan substrat mengalami perubahan konformasi sehingga sisi aktif substrat tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif

enzim dan menyebabkan turunnya aktivitas enzim (Kosim dan Surya, 2010). Hal ini sebagaimana dinyatakan oleh Rabelo *et al.* (2011) bahwa kenaikan suhu menyebabkan penurunan aktivitas enzim disebabkan oleh perubahan konformasi enzim dalam larutan.

Pada penelitian ini belum ditemukan kondisi optimum pH dan suhu dalam reaksi enzimatik protease dari *indigenus* bekatul dimana terjadi ketidakstabilan aktivitas enzim pada kenaikan variasi pH dan suhu yang dikaji. Hasil aktivitas enzim protease dari *indigenus* bekatul diperoleh aktivitas tertinggi pada suhu 37°C pada pH 7 sebesar 0,01288 U/mL yang artinya setiap ml ekstrak enzim protease yang dihasilkan mampu memecah protein kasein dan menghasilkan 0,01288 mikromol tirosin. Aktivitas enzim protease dari *indigenus* bekatul diperoleh aktivitas terendah pada suhu 45°C pada pH 8 sebesar 0,00753 U/mL. Hasil ini sejalan dengan penelitian Badriyah dan Ardyati (2013) yang melakukan uji aktivitas proteolitik isolat bakteri asal ampas tahu pada substrat bekatul yang mencapai aktivitas optimum pada pH 7 dan suhu 37°C dengan aktivitas protease sebesar 2,24 U/mL. Berbeda dengan hasil penelitian Umayya (2019) yang melakukan uji aktivitas dalam berbagai suhu dengan pH netral menunjukkan bahwa aktivitas protease tertinggi diperoleh isolate K pada suhu 30°C sebesar 0,7203 U/ml. Hasil aktivitas enzim diperoleh pada penelitian ini memiliki aktivitas yang rendah dibanding dengan aktivitas protease Umayya (2019). Hal ini disebabkan terjadi kesalahan dalam peremajaan enzim yang seharusnya remajakan pada media *Spesifik Borth* tetapi diremajakan pada media umum yaitu Na. Penumbuhan bakteri aktif diperlukan media cair (*Spesifik Borth*) yang terdiri dari ekstrak daging sapi, pepton dan aquades. Komposisi bahan tersebut diperlukan

bakteri diantaranya untuk pertumbuhan sel, pembentukan energy, dan penangkapan elektron (Mulyani,2010). Hal ini dikarenakan setiap jenis bakteri membutuhkan komposisi dan lingkungan media pertumbuhan tertentu agar tumbuh optimal (Nurkasanah, 2015).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa interaksi pH dan suhu tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease dan aktivitas tertinggi enzim protease dari *indigenous* bekatul diperoleh pada pH 7 dan suhu 37°C sebesar 0,01288 U/mL. Berbeda dengan hasil penelitian ini, hasil penelitian Noviasari (2016) menunjukkan bahwa suhu dan pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease dari *Bacillus mycoides* yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak. Interaksi antara suhu dan pH yang tertinggi terdapat pada suhu 60°C dan pH 8 dengan nilai aktivitas sebesar 0,2759 U/mL. Hasil berbeda juga dilaporkan oleh Faizah (2017) bahwa suhu dan pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease *Bacillus subtilis* dari Daun Kenikir (*Cosmos sulphureus*) yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak. Aktivitas protease tertinggi diperoleh pada perlakuan interaksi suhu 55°C dan pH 8 sebesar 1,511 U/ml, sedangkan aktivitas protease terendah diperoleh pada perlakuan interaksi suhu 25°C dan pH 7 sebesar 0,063 U/ml. Penelitian tersebut melakukan kajian interaksi suhu 25°C, 35°C, 45°C, dan 55°C, dengan pH 7, 8, dan 9.

Penelitian yang dilakukan oleh Faizah (2017) dan Noviasari (2016) melakukan kajian interaksi pH dan suhu dimana variasi pH dan suhu yang dikaji dilakukan dengan menggunakan interval yang seragam dan suhu dilakukan sampai lebih dari 45°C dengan hasil aktivitas protease optimum lebih pada suhu dari 45°C pada kedua penelitian. Sementara penelitian ini, variasi suhu yang dikaji

dilakukan dengan menggunakan interval yang berbeda-beda dan suhu hanya dilakukan sampai 45°C. Ketidakteraturan variasi suhu yang digunakan dalam penelitian ini dimungkinkan menjadi faktor yang menyebabkan tidak adanya pengaruh interaksi pH dan suhu terhadap aktivitas protease. Selain itu, juga masih adanya kemungkinan peningkatan aktivitas protease pada suhu lebih dari 45°C yang mana hal tersebut tidak dikaji dalam penelitian ini sehingga aktivitas optimum belum didapatkan. Hal ini sebagaimana dinyatakan oleh Sari (2017) bahwa enzim akan bekerja maksimal atau mempunyai aktivitas maksimal dan efisien jika berada pada kondisi yang optimum dan setiap enzim mempunyai kondisi optimum yang berbeda-beda.

4.3 Pemanfaatan Bekatul dalam Perspektif Islam

Allah SWT. menciptakan segala sesuatu memiliki manfaat bagi makhluk hidup lainnya. Salah satunya adalah penciptaan tumbuh-tumbuhan yang memiliki manfaat dan kandungan yang berguna bagi makhluk hidup seperti manusia dan hewan. Hal ini adalah bukti dari kekuasaan Allah SWT. bahwa segala yang diciptakan memiliki kegunaan sebagaimana firman Allah SWT. dalam al-Qur'an surat al-Anbiya' (12) ayat 16:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لَعِبِينَ

Artinya: *“Dan tidaklah Kami ciptakan langit dan bumi dan segala yang ada diantara keduanya dengan sia-sia”*

Tafsir al-wasith jilid 2 menyatakan bahwa semua yang dari Allah adalah adil dan hak. Tidakkah Allah menciptakan langit, bumi dan segala isinya melainkan

suatu kebenaran yang memiliki proporsi dan manfaat. Allah SWT. menciptakan langit, bumi dan isinya agar menjadi dalil atas pengetahuan Pencipta terhadap itu semua dan untuk manfaat-manfaat duniawi lainnya (az-Zuhaili, 2013).

Bekatul memiliki bakteri proteolitik yang berguna bagi kehidupan manusia. Keberadaan mikroorganisme ini dijelaskan oleh Allah SWT. dalam surah al-Baqaroh ayat 26 yang berbunyi:

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

“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 ini (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk, dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik” (QS. al-Baqaroh: 26)

Al-Maraghi (1993) menjelaskan bahwa yang dimaksud dengan lebih kecil dibanding nyamuk adalah sesuatu yang tampak lebih kecil bentuknya dibanding nyamuk, misalnya mikroorganisme. Allah SWT. yang Maha Mengetahui lebih mengetahui hikmah yang terkandung dalam pengungkapan perumpamaan ini. Bagi orang-orang yang sudah terbiasa melakukan kebaikan, mereka akan sadar dan mempunyai pandangan secara seksama maka ketika mendengar perumpamaan tersebut mereka justru mendapatkan suatu petunjuk dan inspirasi.

Sebab, mereka akan menghargai sesuatu sesuai dengan kemanfaatannya masing-masing. Hal ini dijelaskan juga dalam hadis.

فَلَا يَغْرَسُ الْمُسْلِمُ غَرْسًا فَيَاكُلُهُ إِنْسَانٌ وَلَا دَابَّةٌ وَلَا طَيْرٌ إِلَّا كَانَ لَهُ صَدَقَةٌ إِلَى يَوْمِ الْقِيَامَةِ

“tidaklah seorang muslim menanam tanaman lalu tanaman itu dimakan manusia, binatang ataupun burung melainkan tanaman itu menjadi sedekah baginya sampai hari kiamat” (HR. Imam muslim)

Hadis di atas menjelaskan bahwa pelestarian bumi adalah tanggung jawab semua makhluk hidup, dan makhluk-makhluk Allah saling menyeimbangkan satu sama lain. Hadis di atas juga menjelaskan bahwa tanaman pangan itu bisa memberikan banyak manfaat terhadap makhluk lain sebagai sedekah sampai hari kiamat. Tanaman pangan dianjurkan oleh Rasulullah untuk ditanam meskipun sebelum terjadinya hari kiamat. Pemanfaatan tanaman pangan tersebut karena adanya kandungan yang bisa dijadikan olahan ataupun produk turunan lain yang bisa meningkatkan harga atau efisiensi, salah satunya tanaman padi. Hal ini menandakan bahwa tanaman pangan (padi/bekatul) mempunyai manfaat yang banyak untuk kehidupan, salah satunya untuk pembuatan enzim.

BAB V

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh yang berbeda nyata antara pH dan suhu terhadap aktivitas enzim protease dari *indigenus* bekatul. Aktivitas tertinggi enzim protease diperoleh pada perlakuan suhu 37°C pada pH 7 dengan aktivitas enzimnya sebesar 0,01288 U/mL. Aktivitas enzim terendah diperoleh pada perlakuan suhu 45°C pada pH 8 dengan aktivitas enzimnya sebesar 0,00753 U/mL.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu

1. Perlu dilakukan penelitian sejenis dengan menggunakan bakteri jenis lain dengan variasi pH dan suhu yang berbeda.
2. Perlu dilakukan pengujian pengaruh faktor lain yang mempengaruhi aktivitas protease seperti konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, waktu inkubasi.
3. Perlu dilakukan pengujian peremajaan isolat bakteri proteolitik pada media spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrio, J.L dan A.L. Demain. 2014. Microbial Enzymes: Tool for biotechnological process. *Biomolecules*, 4:117-139.
- Ali, S. dan Muhammad, Y.G. 2017. Industrial Application Of Microbial Proteases. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 4(6), 623-629.
- Apriyanto, A., Fardiaz, D., Puspitasari, N. L., Sedamawati, dan Budiyanto, S. 1983. *Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan*. Bogor: IPB press.
- Asriadiawaluddin. 2016. 4 bakteri proteolitik bakteri yang tergolong proteolitik. <https://www.coursehero.com/file/p429dod/4-Bakteri-Proteolitik-Bakteri-yang-tergolong-proteolitik-adalah-bakteri-yang/>
- Astawan M. dan A. Leomitro. 2009. *Khasiat Whole Grain: Makanan Kaya Serat untuk Hidup Sehat*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Astawan, M. dan Febrinda, A.E. 2010. Potensi Dedak dan Bekatul Beras Sebagai Ingredient Pangan dan Produk Pangan Fungsional. *PANGAN*. 19(1).
- Aulan' niam. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Citra Mentri Group. Malang.
- Auliana, R. 2018. Pembuatan Tempe Bekatul dan Kandungan Gizinya. *Home Economics Journal*. Vol. 1, No. 2.
- Badriyah, B.I. dan Ardyati, T. 2013. Deteksi Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri Asal Ampas Tahu Pada Substrat Bekatul. *Jurnal Biotropika*, 1(3).
- Baehaki A., dkk. 2005. Karakteristik Protease dari Bakteri Patogen Ikan *Aeromonas hydrophilla*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 8(2):60-72.
- Baehaki, A. 2008. Purifikasi dan Karakterisasi protease dari bakteri pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol XIX, No. 1: 80-87.
- Balqis, U. dan Fahrimal, Y. 2011. Penentuan Temperatur Optimum Terhadap Aktivitas Protease Serin Yang Dihasilkan Oleh Stadium L3 *Ascaridia galli*. FSD Universitas Syiah Kuala.
- Bergmeyer H. U dan M. M. Grassal. 1983. *Method of enzymatic analysis*. Edisi ke 2. Weinheim: Verlag Chemie.
- ChaoHK, Koyama A. 1997. *Korean Natural Farming: Indigenous Microorganisms and Vital Power of Crop/Livestock*. Korean Natural Farming.
- Damayanti E., Kustiyah L., Khalid M., dan Farizal H. 2010. Aktivitas Antioksidan Bekatul Lebih Tinggi daripada Jus Tomat dan Penurunan aktivitas antioksidan serum setelah intervensi minuman kaya antioksidan. *Jurnal Gizi dan Pangan*. Vol. 5, No. 3.
- Dhillon, A., Sharma, K., Rajulapati, V., Goyal, A. 2018. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Production, Isolation and Purification of*

- Industrial Products*, Edition: 1, Chapter: 7, Publisher: Elsevier Radarweg, Amsterdam,
- 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
- Dwijoseputro, D. 1994. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Faizah, M. 2017. *Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease Bacillus subtilis dari daun kenikir yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Faizah, M. 2017. *Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease Bacillus subtilis dari daun kenikir (Cosmos sulphureus) yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak*. Undergraduate thesis, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia.
- Farrell, D. J., Hutton, K. 1990. *Rice and rice milling by-product*. In: Thacker, P.A.; Kirkwood, R. N.; (eds.): *Nontraditional feed sources for use in swine production*. Butterworth Publisher. Stoneham/USA.
- Gomaa, E.Z. 2013. Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on *Ficus nitida* wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(2): 529-537.
- Gupta, A., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K., Gupta, M.N. 2005. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *J Chromatogr A*. 1075(1-2): 103-108.
- Harisman, F.R., Sugiarso, D. 2014. Pengaruh Waktu Penggilingan Terhadap Kadar Zat Besi dalam Ampas Sari Kedelai Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* Vol. 3, No. 2, hal. 2337-3520.
- Henderson, A.J., Ollila, C.A., Kumar, A., Borresen, E.C., Raina, K., Agarwal, R., Ryan E.P. 2012. Chemopreventive properties of dietary rice bran: current status and future prospects. *Adv Nutr*. 3(5):643-53.
- Herlet, J., Kornberger, P., Roessler, B., Glanz, J., Schwarz, W.H., Liebl, W. dan Zverlov, V.V. 2017. A new method to evaluate temperature vs. pH activity profiles for biotechnological relevant enzymes. *Biotechnol Biofuels*. Vol. 10, hal. 234.
- Irianto, K. 2007. *Mikrobiologi: Menguk Dunia Mikroorganisme Jilid 2*, C. Yrama Widya, Bandung.
- Jakubowski, H. 2010. Online Biochemistry: Protein Structure: Thermodynamics and IMFs in Protein Stability. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/olhydr ophobprot.html>

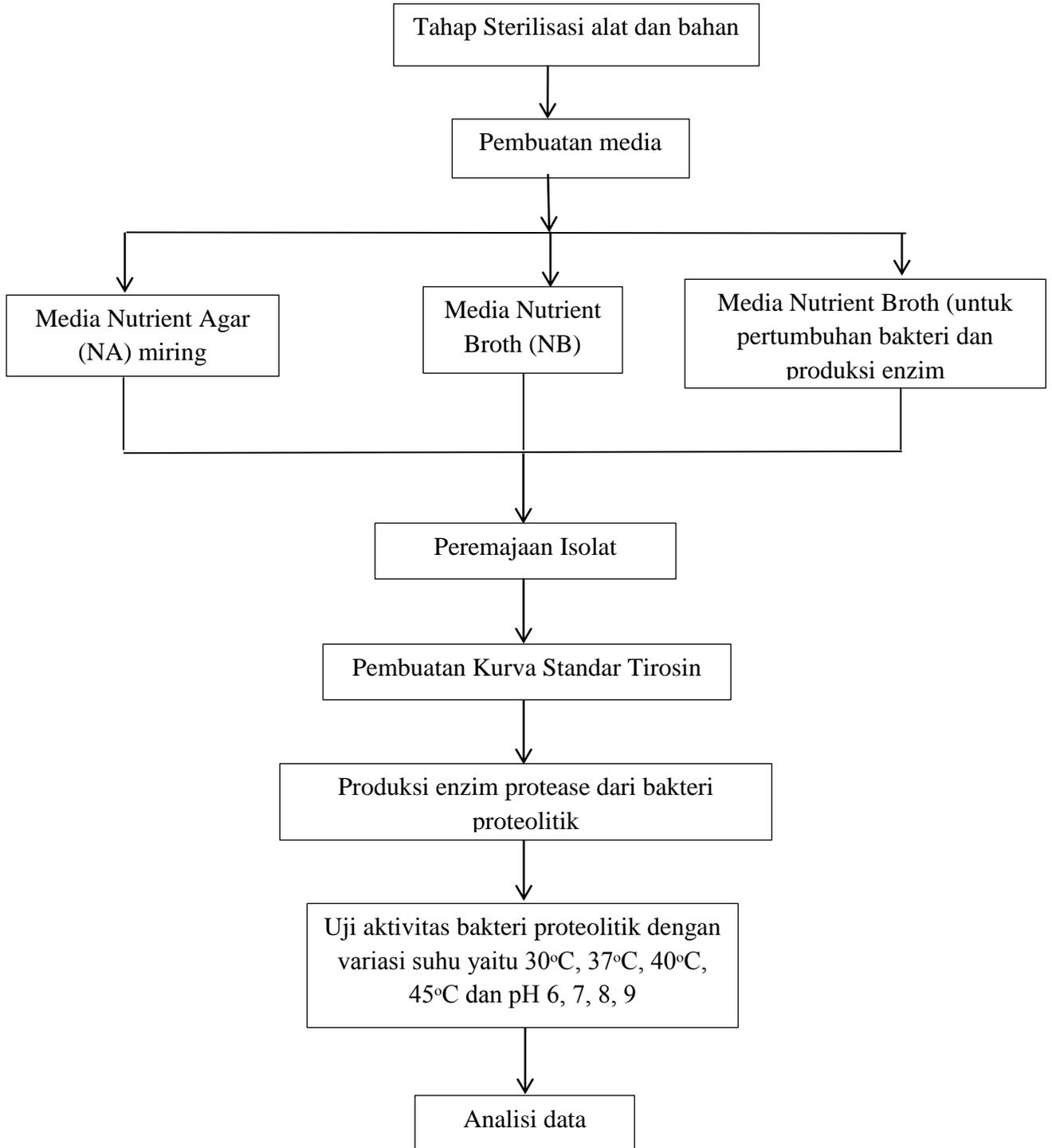
- Kamandalu A.A.N.B., Sutami, N.P., Aryawati, S., Wahyuni, S. 2014 dalam Dinas Tanaman Pangan dan Hortikultura Provinsi Jawa Barat. 2018. Mengubah Bekatul Menjadi Tepung Rendah Lemak. <http://distan.jabarprov.go.id/distan/blog/detail/2941-mengubah-bekatul-menjadi-tepung-rendah-lemak>
- Kharisma T. 2015. *Studi hipokolesterolemik beras analog secara in vivo pada tikus sprague dawley (SD)*. Tesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kosim, M., Surya, R.P. 2010. *Pengaruh Suhu pada Protease dari Bacillus subtilis*, Fakultas MIPA ITS, Surabaya.
- Lehninger, A.L. 1993. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Terjemahan: M. Thenawidjaja. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia*. Thenawidjaja M, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Principles of Biochemistry*.
- Lehninger, A.L. 1998. *Biochemistry*. New York: Academic Press.
- Lesnussa, T., Hattu, N. dan Dulanlebit, Y.H. 2019. Analisis Kadar Kalsium (Ca) Dan Fosfor (P) Pada Daun Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L) Di Pulau Ambon Dan Seram Bagian Barat. *MJoCE*. Vol 9, No 1, hal. 46-54.
- Lestari, P., Reflinur, dan Koh, H.J. 2014. Dalam Tuarita, M.Z., Sadek, N.F., Sukarno, Yuliana, N.D. dan Budijanto, S. 2017. Pengembangan Bekatul sebagai Pangan Fungsional: Peluang, Hambatan, dan Tantangan. *Jurnal Pangan*.
<http://jurnalpangan.com/index.php/pangan/article/download/354/308>.
- Mótyán, J.A., Tóth, F. dan Tőzsé, J. 2013. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*. 3(4): 923–942.
- Mulyani, W, dkk. 2010. Uji Ekstrak Bawang Bombay sebagai Bahan Anti Bakteri Gram Positif *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Cakram. *Jurnal BIOMA*. Vol. 12, No.2, hal. 69-73.
- Naiola, E dan Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, Seleksi Dan Optimasi Produksi Protease Dari Beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi*. 6(3): 467.
- Nelson, D.L., dan Cox, M.M. 2005. *Principles of Biochemistry*. Ed ke4. New York: Worth Publisher.
- Nia. 2010. Pengolahan Sampah dengan Membuatnya Menjadi Kompos. Solo: *Artikel Kompos*
- Noviasari, D. 2015. *Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim protease dari Bacillus mycoides yang ditumbuhkan dalam media campuran limbah cair tahu dan dedak*. Undergraduate thesis, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

- Noviyanti, T., Ardiningsih, P. Rahmalia, W. 2012. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *JKK*. Vol. 1 , No. 1, Hal. 31-34.
- Nurkasanah, S, and Widodo. 2015. The Effect of different Media Content on Protease Activity *Bacillus Subtilis*. Universitas Brawijaya Malang.
- Nuzulah, Y.F. dan Suharti. 2018. Initial Characterization Of Alkaline Protease From Pseudomonas Sp Isolated From Chicken Feces (Poster). *Jurnal Kimia Riset*, Vol. 3, No.2.
- Olson, A., G.M. Gray, dan M.Chiu. 1987. Chemistry and Analysis of Soluble Dietary Fiber. *Journal of Food Technology*. 41(2):71-75.
- Pertanian.go.id, 2017. Optimis Produksi Beras 2018, Kementan Pastikan Harga Beras Stabil. Kementerian Pertanian Republik Indonesia. <https://www.pertanian.go.id/home/?show=news&act=view&id=2614>.
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, T. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Rabelo, M.C., Fontes, C.M.L., dan Rodrigues, S. 2011. Stability Study of Crude Dextranucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742. *Indian J Microbiol*. Vol. 51, No. 2, hal. 164–170.
- Rao MB Tanksale AM, Ghatge MS, Desphande VV. 1998. *Molucular Abd Biotechnologi Aspects Of Microbialproteases*. *Microbol Mol Biol* 62 (3): 597-635.
- Robinson, P.K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*. 59:1-41.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Sari, N. 2017. *Pengaruh pH dan Suhu terhadap aktivitas enzim fibrinolitik Bacillus megaterium* 9.1. Skripsi. Universitas Airlangga.
- Sayem, S.M.A., Alam, M.J., dan Hoq, M.M. 2006. Effect of temperature, ph and metal ions on the activity and stability of alkaline protease from novel bacillus licheniformis MZK03. *Proc. Pakistan Acad. Sci*. 43(4): 257-262.
- Siregar, H. 1981. *Budidaya Tanaman Padi Indonesia*. Bogor: Sastra Hudaya.
- Sumantha, A., Deepa, P., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C.R. dan Pandey, A.. 2006. Rice Bran as a Substrate for Proteolytic Enzyme Production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49(5): 843-851.
- Sumarlin, La ode. 2008. Aktivitas Protease dari *Bacillus Circualans* Pada Media pertumbuhan Dengan pH Tidak Terkontrol. UIN Syarif Hidayatullah jakarta
- Susanti, Elfi. 2002. *Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bacillus Subtilis 1012M15*. Biodiservitas Vol 4.

- Thahir R. 2010. Revitalisasi Penggilingan Padi melalui Inovasi Pendukung Swasembada Beras dan Persaingan Global. *Buletin Pengembangan Inovasi Pertanian*. 3(3): 171–183.
- Tuarita, M.Z., Sadek, N.F., Sukarno, Yuliana, N.D. dan Budijanto, S. 2017. Pengembangan Bekatul sebagai Pangan Fungsional: Peluang, Hambatan, dan Tantangan. *Jurnal Pangan*. <http://jurnalpangan.com/index.php/pangan/article/download/354/308>.
- Umayyah I. 2019. *Isolasi Bakteri Proteolitik dari Bekatul dan Uji Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Suhu*. Skripsi. Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Vidyalakshmi, A., dan Selvi, S.E. 2013. Protease Activity of Floral Extracts of *Jasminum grandiflorum* L., a Wound Healing Herb. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 1(4).
- Viswanathan, K., Rebecca, J., dan Arumugam, P. 2017. Optimization of protease enzyme production by marine actinomycetes. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 8(3): 188-194.
- Wardani, A.K. and Nindita, L.O. 2012. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri hasil isolasi dari Whey tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 13(3): 149-156.
- Widowati S. 2001. Pemanfaatan Hasil Samping Penggilingan Padi dalam Menunjang Sistem Agroindustri di Pedesaan. *Buletin AgroBio*. 4(1) : 33–38.
- Widowati, S. dan Misgiyarta. 2002. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor.
- Wise, C. 1989. *Rice Bran Lowers Blood Cholesterol*. State News Service. Maryville. Appeal Democrat.
- Wuryanti. 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivasi Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.). *JKSA*, Vol. VII No. 3, hal. 83-87.
- Yusriah dan Kuswytasari, N.D. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, Vol. 2, No.1.
- Yusriah, Y., dan Kuswytasari, N.D. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 2(1).
- Zubaidah, E., Martati, E., Resmanto, A.M. 2014. Pertumbuhan Isolat Bal Asal Bekatul Dan Probiotik Komersial (*Lactobacillus Acidophilus* Dan *Lactobacillus Casei*) Pada Media Bekatul Dan Susu Skim. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 1(1).

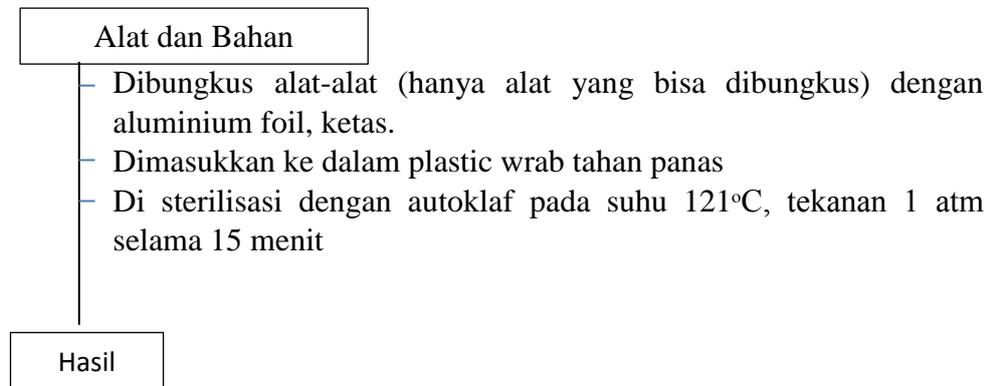
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



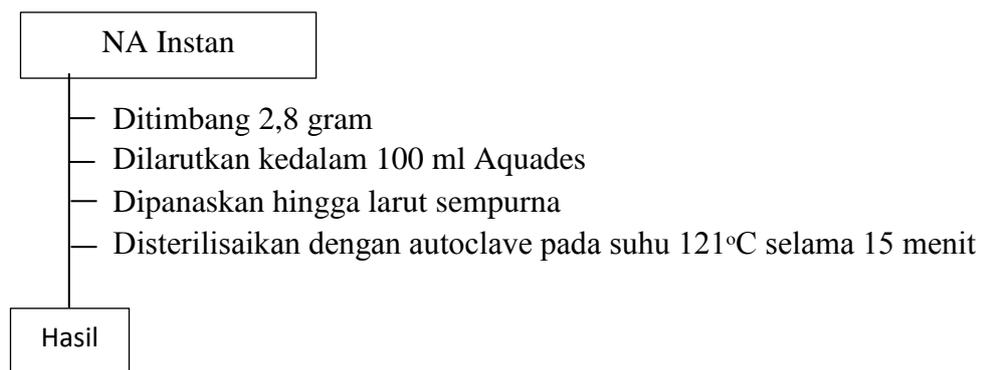
Lampiran 2. Diagram Alir

1. Tahapan Sterilisasi alat dan bahan

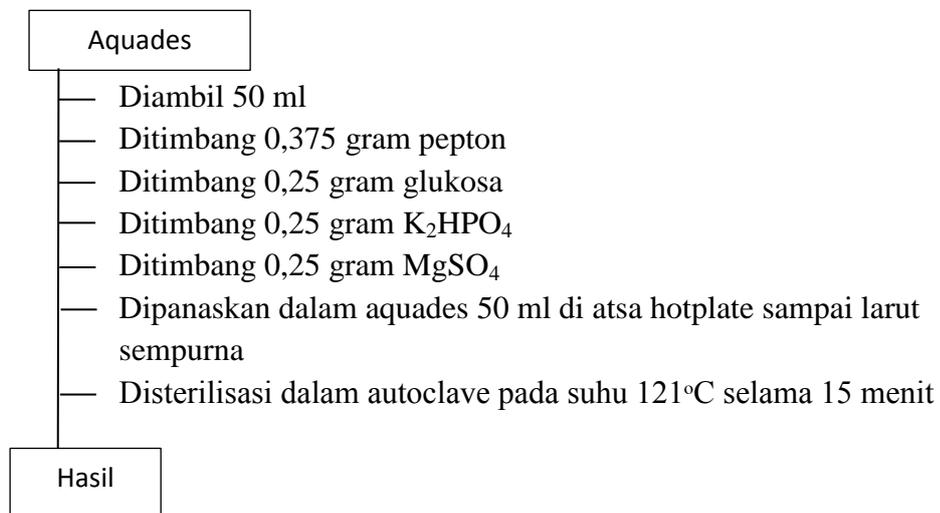


2. Pembuatan media

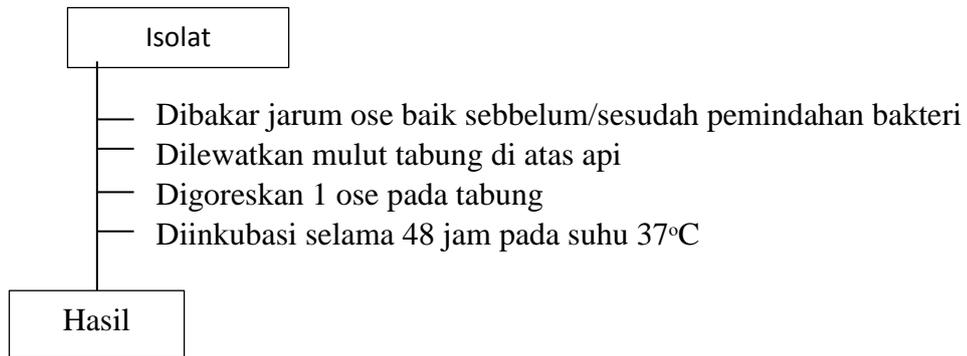
2.1 Media Nutrien Agar (NA)



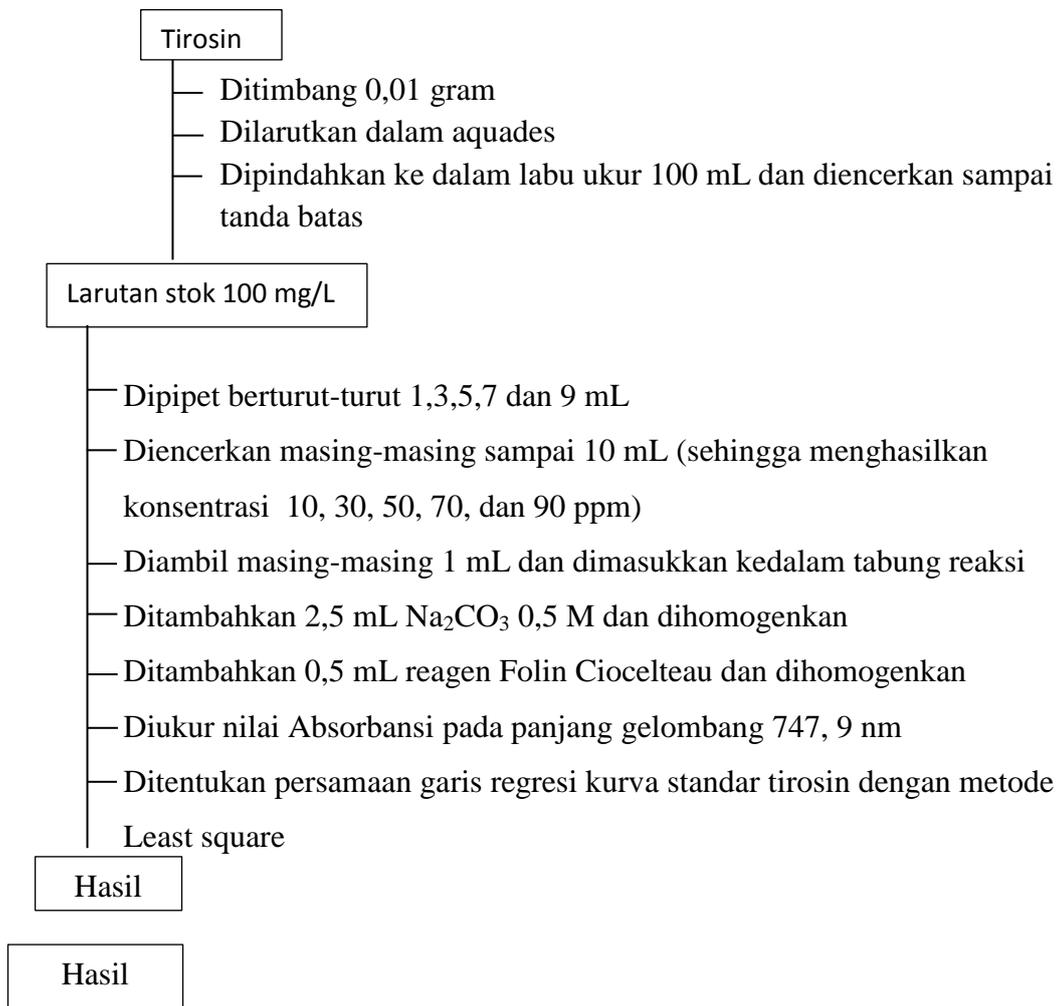
2.2 Media Spesifik Borth



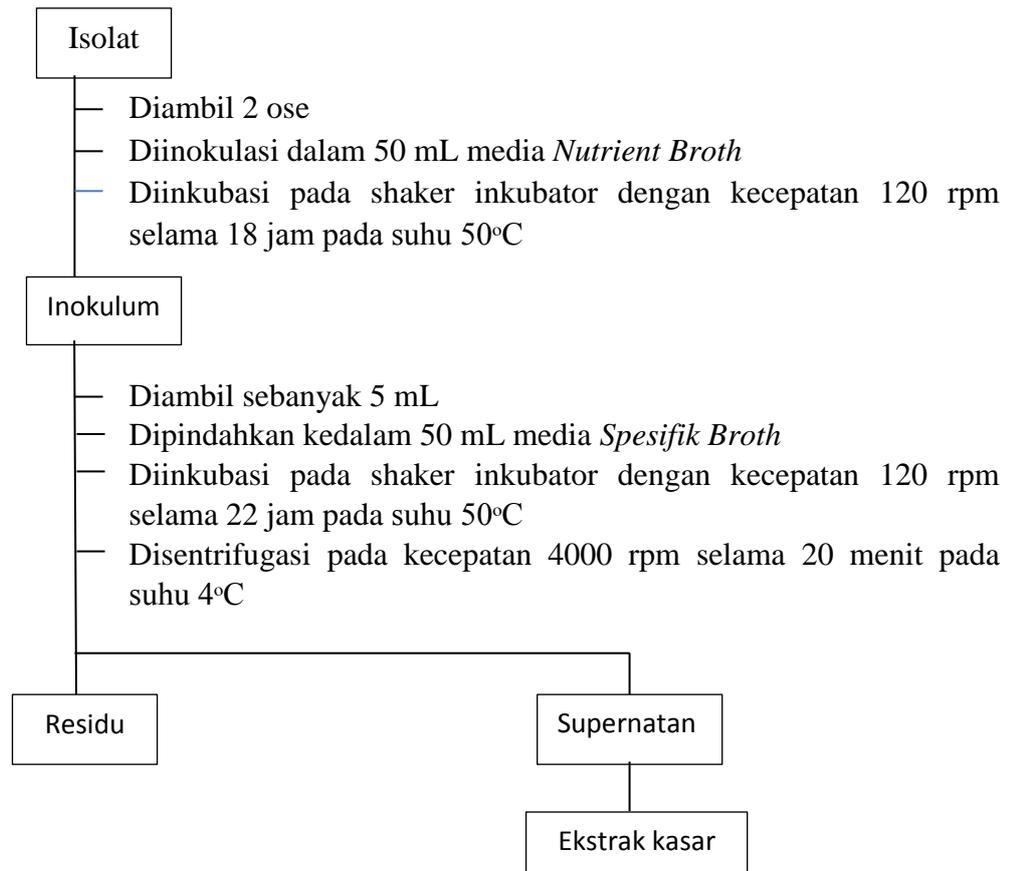
3. Peremajaan Isolat



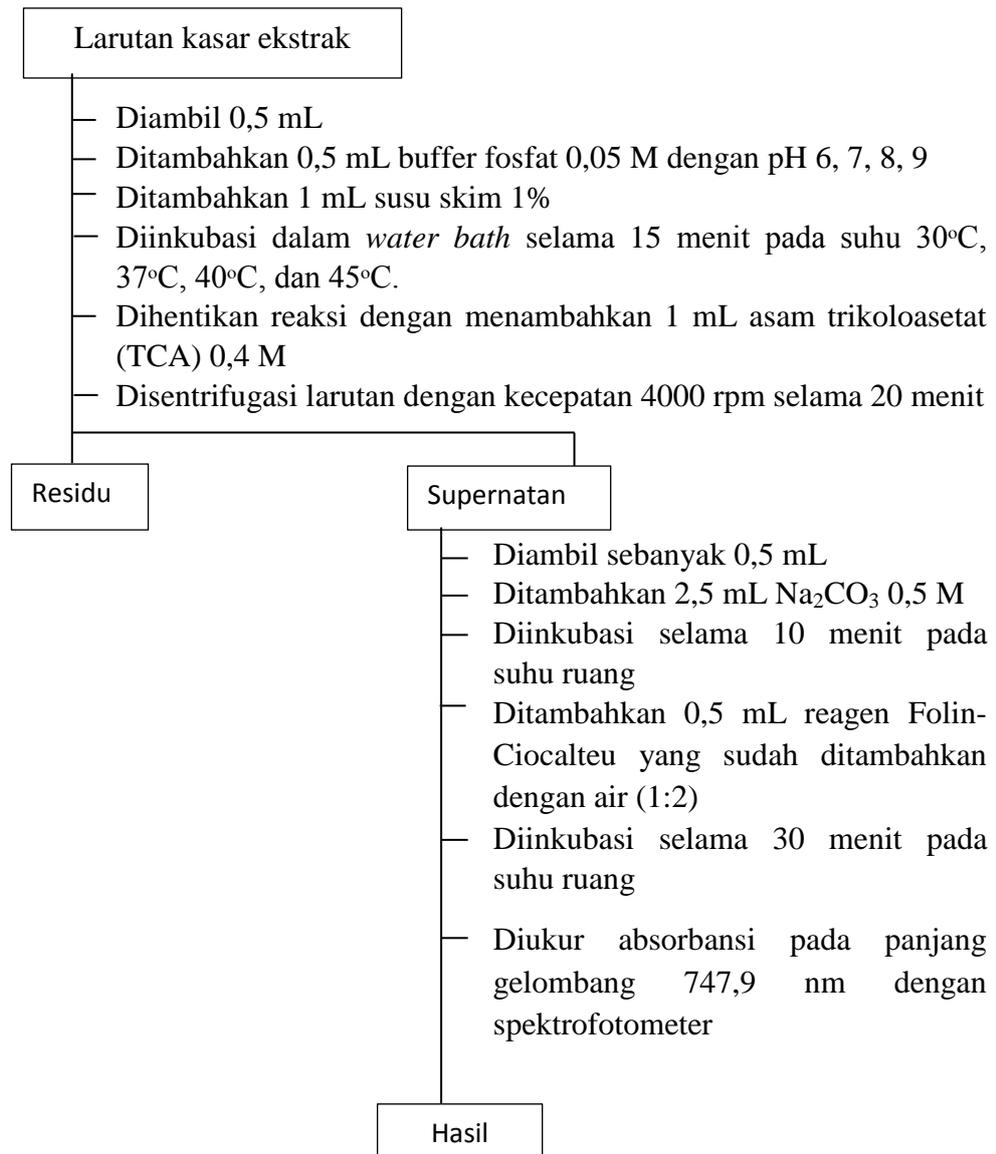
4. Pembuatan Kurva Standar Tirosin



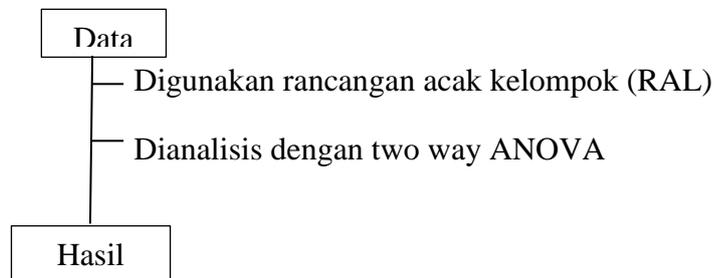
5. Produksi enzim protease dari bakteri proteolitik



6. Uji aktivitas bakteri proteolitik dengan variasi suhu dan pH



7. Analisis data



Lampiran 3. Pembuatan Media dan Reagen

3.1 Pembuatan Media *Nutrient* Agar dalam 100 mL

Sebanyak 0,75 gram bacto agar, 0,5 gram glukosa, 0,75 gram pepton, 0,5 gram KH_2PO_4 , dan 0,5 gram MgSO_4 di larutkan ke dalam 100 mL aquades (di seterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit).

3.2 Pembuatan Media Spesifik Borth

Sebanyak 0,25 gram glukosa, 0,375 gram pepton, 0,25 gram KH_2PO_4 , dan 0,25 gram MgSO_4 di larutkan ke dalam 50 mL aquades (di seterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit).

LAMPIRAN 4

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 0,04 mg/mL dibutuhkan 0,1 g tirosin.

Kemudian dilarutkan kedalam 250 mL aquades. Selanjutnya dibuat larutan

tirosin dengan konsentrasi 0,04, 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 0,004 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 0,004 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 mg/mL

d. Konsentrasi 0,004 mg/mL

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

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

$$\frac{0,28 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = M_2$$

0,0028 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 mg/mL

b. pengukuran Absorbansi dan aktivitas ekstrak kasar protease

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

Diketahui: konsentrasi protease pada ulangan 1, II, dan III

| Perlakuan | | Ulangan | | | Rata-Rata |
|-----------|----|---------|--------|--------|-----------|
| Suhu | pH | I | II | III | |
| 30°C | 6 | 0,4040 | 0,0103 | 0,3784 | |
| | 7 | 0,0025 | 0,4660 | 0,4358 | |
| | 8 | 0,4814 | 0,4487 | 0,3778 | |
| | 9 | 0,4117 | 0,5039 | 0,4120 | |
| 37°C | 6 | 0,3423 | 0,4442 | 0,4883 | |
| | 7 | 0,4681 | 0,5028 | 0,5360 | |
| | 8 | 0,4758 | 0,4358 | 0,4870 | |
| | 9 | 0,4470 | 0,4984 | 0,5433 | |
| 40°C | 6 | 0,3454 | 0,4374 | 0,4531 | |
| | 7 | 0,4088 | 0,4887 | 0,5052 | |
| | 8 | 0,4609 | 0,4321 | 0,4013 | |
| | 9 | 0,4625 | 0,4772 | 0,4135 | |
| 45°C | 6 | 0,3411 | 0,3860 | 0,3210 | |
| | 7 | 0,4025 | 0,4381 | 0,4530 | |
| | 8 | 0,4512 | 0,3639 | 0,4247 | |
| | 9 | 0,4598 | 0,4291 | 0,4342 | |

**LAMPIRAN 5 PERHITUNGAN
ULANGAN I**

$$\begin{aligned} P1T1 &= \frac{[0,4040]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,022 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0104 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P2T1 &= \frac{[0,4589]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0118 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P3T1 &= \frac{[0,4814]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0026 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0123 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P4T1 &= \frac{[0,4117]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0105 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P1T2 &= \frac{[0,3710]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0020 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0095 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P2T2 &= \frac{[0,4681]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,01205 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P3T2 &= \frac{[0,4758]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0026 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0122 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$P4T2 = \frac{[0,0,4470]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10$$

$$\begin{aligned} &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0115 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P1T3 &= \frac{[0,4148]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0106 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P2T3 &= \frac{[0,4088]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0105 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P3T3 &= \frac{[0,4609]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0118 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P4T3 &= \frac{[0,4625]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0119 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P1T4 &= \frac{[0,3411]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0018 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0087 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P2T4 &= \frac{[0,4025]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0103 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P3T4 &= \frac{[0,4512]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\ &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\ &= 0,0116 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P4T4 &= \frac{[0,4598]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\
 &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 &= 0,0112 \text{ U/mL} \\
 &= 0,0118 \text{ U/MI}
 \end{aligned}$$

ULANGAN II

$$\begin{aligned}
 P1T1 &= \frac{[0,4001]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0103 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P2T1 &= \frac{[0,4660]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0119 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P3T1 &= \frac{[0,4487]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0115 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P4T1 &= \frac{0,5039}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0027 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0129 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P1T2 &= \frac{[0,4442]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0114 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P2T2 &= \frac{[0,5028]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0027 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0129 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$P3T2 = \frac{[0,4358]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10$$

$$\begin{aligned}
 P4T2 &= \frac{[0,4984]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0027 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0128 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P1T3 &= \frac{[0,4374]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0112 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P2T3 &= \frac{[0,4887]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0027 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0125 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P3T3 &= \frac{[0,4231]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0023 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0108 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P4T3 &= \frac{[0,4772]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0026 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0122 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P1T4 &= \frac{[0,4495]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0115 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P2T4 &= \frac{[0,4381]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 \\
 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\
 &= 0,0112 \text{ U/mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P3T4 &= \frac{[0,3858]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0029 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0021 \times 0,466] \times 10 &= 0,0137 \text{ U/mL} \\ &= 0,0099 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P4T4 &= \frac{[0,4291]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0026 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0023 \times 0,466] \times 10 &= 0,0125 \text{ U/mL} \\ &= 0,0110 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

ULANGAN III

$$\begin{aligned} P1T1 &= \frac{[0,3784]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 &= 0,0139 \text{ U/mL} \\ &= 0,0097 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P2T1 &= \frac{[0,4358]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0024 \times 0,466] \times 10 &= 0,0116 \text{ U/mL} \\ &= 0,0112 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P3T1 &= \frac{[0,3778]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0020 \times 0,466] \times 10 &= 0,0130 \text{ U/mL} \\ &= 0,0097 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P4T1 &= \frac{[0,4120]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 &= 0,0103 \text{ U/mL} \\ &= 0,0106 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P1T2 &= \frac{[0,4883]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0027 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0026 \times 0,466] \times 10 &= 0,0130 \text{ U/mL} \\ &= 0,0125 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P2T2 &= \frac{[0,5360]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 &= 0,0106 \text{ U/mL} \\ &= 0,0106 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P1T3 &= \frac{[0,4531]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 &= 0,0103 \text{ U/mL} \\ &= 0,0116 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P2T3 &= \frac{[0,5052]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0027 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0027 \times 0,466] \times 10 &= 0,0130 \text{ U/mL} \\ &= 0,0130 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P3T3 &= \frac{[0,4013]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 &= 0,0103 \text{ U/mL} \\ &= 0,0103 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P4T3 &= \frac{[0,4135]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0022 \times 0,466] \times 10 &= 0,0106 \text{ U/mL} \\ &= 0,0106 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P1T4 &= \frac{[0,3210]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0017 \times 0,466] \times 10 \\ &= [0,0017 \times 0,466] \times 10 &= 0,0082 \text{ U/mL} \\ &= 0,0082 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P2T4 &= \frac{[0,4530]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0023 \times 0,466] \times 10 \\
 &= [0,0025 \times 0,466] \times 10 &= 0,00109 \text{ U/mL} \\
 &= 0,0116 \text{ U/mL} & \\
 P3T4 &= \frac{[0,4247]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &= [0,0023 \times 0,466] \times 10 \\
 & &= 0,0117 \text{ U/mL} \\
 P4T4 &= \frac{[0,4342]}{181} \times \frac{3,5}{0,5 \times 15} \times 10 &
 \end{aligned}$$

Tabel 4.1 Hasil Aktivitas Enzim Protease berdasarkan pH dan Suhu

| Ph | Suhu | Aktivitas enzim (U/mL) |
|-----------|-------------|-------------------------------|
| 6 | 30°C | 0,01013 |
| | 37°C | 0,01113 |
| | 40°C | 0,01113 |
| | 45°C | 0,00947 |
| 7 | 30°C | 0,01163 |
| | 37°C | 0,01288 |
| | 40°C | 0,01200 |
| | 45°C | 0,01103 |
| 8 | 30°C | 0,01117 |
| | 37°C | 0,01197 |
| | 40°C | 0,01097 |
| | 45°C | 0,00753 |
| 9 | 30°C | 0,01133 |
| | 37°C | 0,01273 |
| | 40°C | 0,01157 |
| | 45°C | 0,01130 |

LAMPIRAN 6 GAMBAR



proses pembuatan media



peremajaan isolat



proses produksi enzim protease



Uji aktifitas enzim protease



Proses sterilisasi alat

LAMPIRAN 7

HASIL OUTPUT SPSS

Tabel keterangan perlakuan

P = pH

P1 = pH 6

P1 = pH 7

P1 = pH 8

P1 = pH 9

T = suhu

T1= 30°C

T1= 37°C

T1= 40°C

T1= 45°C

Hasil Output SPSS

| Between-Subjects Factors | | |
|--------------------------|----|----|
| | | N |
| pH | P1 | 12 |
| | P2 | 12 |
| | P3 | 12 |
| | P4 | 12 |
| Suhu | T1 | 12 |
| | T2 | 12 |
| | T3 | 12 |
| | T4 | 12 |

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Aktivitas

| pH | Suhu | Mean | Std. Deviation | N |
|-------|-------|-----------|----------------|----|
| P1 | T1 | .01013333 | .000378594 | 3 |
| | T2 | .01113333 | .001517674 | 3 |
| | T3 | .01113333 | .000503322 | 3 |
| | T4 | .00946667 | .001778576 | 3 |
| | Total | .01046667 | .001269455 | 12 |
| P2 | T1 | .01163333 | .000378594 | 3 |
| | T2 | .01288333 | .000825126 | 3 |
| | T3 | .01200000 | .001322876 | 3 |
| | T4 | .01103333 | .000665833 | 3 |
| | Total | .01188750 | .001019386 | 12 |
| P3 | T1 | .01116667 | .001331666 | 3 |
| | T2 | .01196667 | .000680686 | 3 |
| | T3 | .01096667 | .000763763 | 3 |
| | T4 | .00753000 | .005641604 | 3 |
| | Total | .01040750 | .003076235 | 12 |
| P4 | T1 | .01133333 | .001357694 | 3 |
| | T2 | .01273333 | .001201388 | 3 |
| | T3 | .01156667 | .000850490 | 3 |
| | T4 | .01130000 | .000435890 | 3 |
| | Total | .01173333 | .001067140 | 12 |
| Total | T1 | .01106667 | .001028090 | 12 |
| | T2 | .01217917 | .001191153 | 12 |
| | T3 | .01141667 | .000881974 | 12 |
| | T4 | .00983250 | .002990005 | 12 |
| | Total | .01112375 | .001893862 | 48 |

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Aktivitas

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | 7.312E-5 ^a | 15 | 4.875E-6 | 1.634 | .119 |
| Intercept | .006 | 1 | .006 | 1991.066 | .000 |
| pH | 2.280E-5 | 3 | 7.599E-6 | 2.547 | .073 |
| Suhu | 3.444E-5 | 3 | 1.148E-5 | 3.849 | .019 |
| pH * Suhu | 1.588E-5 | 9 | 1.764E-6 | .591 | .794 |
| Error | 9.546E-5 | 32 | 2.983E-6 | | |
| Total | .006 | 48 | | | |
| Corrected Total | .000 | 47 | | | |

a. R Squared = .434 (Adjusted R Squared = .168)

Estimated Marginal Means

1. pH

Estimates

Dependent Variable: Aktivitas

| pH | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|----|------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| P1 | .010 | .000 | .009 | .011 |
| P2 | .012 | .000 | .011 | .013 |
| P3 | .010 | .000 | .009 | .011 |
| P4 | .012 | .000 | .011 | .013 |

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Aktivitas

| (I) pH | (J) pH | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. ^b | 95% Confidence Interval for Difference ^b | |
|--------|--------|--------------------------|------------|-------------------|--|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| P1 | P2 | -.001 | .001 | .052 | -.003 | 1.542E-5 |
| | P3 | 5.917E-5 | .001 | .934 | -.001 | .001 |
| | P4 | -.001 | .001 | .082 | -.003 | .000 |
| P2 | P1 | .001 | .001 | .052 | -1.542E-5 | .003 |
| | P3 | .001* | .001 | .044 | 4.375E-5 | .003 |
| | P4 | .000 | .001 | .828 | -.001 | .002 |
| P3 | P1 | -5.917E-5 | .001 | .934 | -.001 | .001 |
| | P2 | -.001* | .001 | .044 | -.003 | -4.375E-5 |
| | P4 | -.001 | .001 | .069 | -.003 | .000 |
| P4 | P1 | .001 | .001 | .082 | .000 | .003 |
| | P2 | .000 | .001 | .828 | -.002 | .001 |
| | P3 | .001 | .001 | .069 | .000 | .003 |

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Aktivitas

| | Sum of Squares | Df | Mean Square | F | Sig. |
|----------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Contrast | 2.280E-5 | 3 | 7.599E-6 | 2.547 | .073 |
| Error | 9.546E-5 | 32 | 2.983E-6 | | |

The F tests the effect of pH. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2. Suhu

Estimates

Dependent Variable: Aktivitas

| Suhu | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|------|------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| T1 | .011 | .000 | .010 | .012 |
| T2 | .012 | .000 | .011 | .013 |
| T3 | .011 | .000 | .010 | .012 |
| T4 | .010 | .000 | .009 | .011 |

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Aktivitas

| (I) Suhu | (J) Suhu | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. ^b | 95% Confidence Interval for Difference ^b | |
|----------|----------|-----------------------|------------|-------------------|---|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| T1 | T2 | -.001 | .001 | .124 | -.003 | .000 |
| | T3 | .000 | .001 | .623 | -.002 | .001 |
| | T4 | .001 | .001 | .090 | .000 | .003 |
| T2 | T1 | .001 | .001 | .124 | .000 | .003 |
| | T3 | .001 | .001 | .288 | -.001 | .002 |
| | T4 | .002* | .001 | .002 | .001 | .004 |
| T3 | T1 | .000 | .001 | .623 | -.001 | .002 |
| | T2 | -.001 | .001 | .288 | -.002 | .001 |
| | T4 | .002* | .001 | .032 | .000 | .003 |
| T4 | T1 | -.001 | .001 | .090 | -.003 | .000 |
| | T2 | -.002* | .001 | .002 | -.004 | -.001 |
| | T3 | -.002* | .001 | .032 | -.003 | .000 |

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: Aktivitas

| | Sum of Squares | Df | Mean Square | F | Sig. |
|----------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Contrast | 3.444E-5 | 3 | 1.148E-5 | 3.849 | .019 |
| Error | 9.546E-5 | 32 | 2.983E-6 | | |

The F tests the effect of Suhu. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

3. Suhu * pH

Dependent Variable: Aktivitas

| Suhu | pH | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|------|----|------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| T1 | P1 | .010 | .001 | .008 | .012 |
| | P2 | .012 | .001 | .010 | .014 |
| | P3 | .011 | .001 | .009 | .013 |
| | P4 | .011 | .001 | .009 | .013 |
| T2 | P1 | .011 | .001 | .009 | .013 |
| | P2 | .013 | .001 | .011 | .015 |
| | P3 | .012 | .001 | .010 | .014 |
| | P4 | .013 | .001 | .011 | .015 |
| T3 | P1 | .011 | .001 | .009 | .013 |
| | P2 | .012 | .001 | .010 | .014 |
| | P3 | .011 | .001 | .009 | .013 |
| | P4 | .012 | .001 | .010 | .014 |
| T4 | P1 | .009 | .001 | .007 | .011 |
| | P2 | .011 | .001 | .009 | .013 |
| | P3 | .008 | .001 | .005 | .010 |
| | P4 | .011 | .001 | .009 | .013 |

**LEMBAR IDENTIFIKASI BAHAYA DAN PENILAIAN RESIKO
KEGIATAN PENELITIAN MAHASISWA**

| JURUSAN KIMIA FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG | IDENTIFIKASI BAHAYA DAN PENILAIAN RESIKO | PENELITIAN SKRIPSI | | | | |
|--|---|--|--|------------|-------------|------------------------|
| | | Jumlah halaman : 2 | | | | |
| JUDUL PENELITIAN : OPTIMASI PRODUKSI PROTEASE DARI BAKTERI PROTEOLITIK <i>INDIGENOUS</i> BEKATUL | | | | | | |
| No | Tahapan Kerja Penelitian | Potensi Bahaya | Upaya Pengendalian | Level | | Tingkat Bahaya (R x P) |
| | | | | Resiko (R) | Peluang (P) | |
| 1 | Preparasi alat dan bahan | <ul style="list-style-type: none"> Menyebabkan iritasi mata dan kulit Tertelan dapat menyebabkan sesak nafas | <ul style="list-style-type: none"> Bilas dengan air +/- 15 menit Menggunakan masker | 1 | 1 | 1 |
| 2 | Pembuatan Media | <ul style="list-style-type: none"> Terkena tetesan larutan AgNO₃ HCl sangat korosif dan toksik serta iritasi bila kontak dengan kulit, mata atau terhirup | <ul style="list-style-type: none"> Hati-hati ketika dalam menambahkan pelarut Jika terkena mata, siram dengan air mengalir ±15 menit. jika terkena kulit, siram dengan air mengalir ±15 menit dan lepaskan pakaian yang terkontaminasi. Jika terhirup segera pindahkan ke ruang terbuka. Dan segera hubungi tim medis Menggunakan APD (jas lab, sepatu dan sarung tangan) | 2 | 2 | 4 |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Terkena tetesan larutan asam sitrat Terkena panas dari alat gelas yang dipanaskan diatas <i>hot plate</i> | <ul style="list-style-type: none"> Jika terkena mata, siram dengan air mengalir ±15 menit. jika terkena kulit, lepaskan pakaian yang terkontaminasi dan siram bagian yang terkena dengan air mengalir ±15 menit. Jika terhirup segera pindahkan ke ruang terbuka. Dan segera hubungi tim medis Menggunakan kain untuk mengambil alat gelas yang dipanaskan | 2 | 1 | 2 |
| 3 | Isolasi bakteri proteolitik dari bekatul | <ul style="list-style-type: none"> Natrium klorida merupakan senyawa yang dapat menyebabkan kontak dengan kulit dapat menyebabkan iritasi untuk sebagian kulit sensitive. Kontak dengan mata menyebabkan iritasi, rasa sakit, dan kemerahan. Terhirup tidak menimbulkan efek berbahaya, namun berkepanjangan dapat menyebabkan iritasi saluran pernafasan. Tertelan dalam jumlah banyak dan | <ul style="list-style-type: none"> Kontak dengan kulit: cuci dengan air yang banyak dan lepaskan pakaian yang terkontaminasi. Kontak dengan mata: bilas dengan air yang banyak dengan kelopak mata terbuka lebar. Hubungi dokter mata. Terhirup: hirup udara segar, berikan napas buatan, berikan masker oksigen jika diperlukan, secepatnya hubungi | 2 | 2 | 4 |

| | | | | | | |
|---|--|---|---|---|---|---|
| | | berkepanjangan dapat menyebabkan timbulnya beberapa penyakit. | dokter. Tertelan: berikan korban air minum yang banyak <ul style="list-style-type: none"> Menggunakan APD yang lengkap | | | |
| 4 | Produksi enzim protease dari bakteri proteolitik | <ul style="list-style-type: none"> Potassium dihydrogen phosphate menyebabkan iritasi mata dan kulit, apabila tertelan menyebabkan diare, mual, muntah dan tidak nyaman | <ul style="list-style-type: none"> Jika terkena mata, siram dengan air mengalir ± 15 menit. Hubungi dokter mata dan lepaskan lensa kontak. jika terkena kulit, lepaskan pakaian yang terkontaminasi, siram dengan air mengalir ± 15 menit n. jika tertelan beri air minum (paling banyak dua gelas), Menggunakan APD (sepatu, jas lab, masker, dan sarung tangan) Lepaskan baju yang terkontaminasi Jika tertelan jangan merangsang muntah | 2 | 2 | 4 |
| 5 | Uji aktivitas bakteri proteolitik | Larutan buffer fosfate menyebabkan iritasi mata dan kulit Larutan trikolo asetat (TCA) menyebabkan korosi kulit, bersifat toksik, menyebabkan kulit terbakar yang parah dan kerusakan mata, iritasi saluran pernafasan Sodium bikarbonat menyebabkan iritasi mata dan kulit serta membrane pernafasan dan mukosa. Jika tertelan dapat menyebabkan korosif pada saluran pencernaan dengan gejala nyeri perut, muntah, diare, kolaps, dan kematian. Bersifat higroskopis (menyerap lembab dari udara) Iritasi kulit dan mata jika terkena kulit menyebabkan kulit terbakar yang parah dan kerusakan mata, korosif terhadap logam | <ul style="list-style-type: none"> Jika terkena mata, siram dengan air mengalir ± 15 menit. Hubungi dokter mata dan lepaskan lensa kontak. jika terkena kulit, lepaskan pakaian yang terkontaminasi, siram dengan air mengalir ± 15 menit n. jika tertelan beri air minum (paling banyak dua gelas), Menggunakan APD (sepatu, jas lab, masker, dan sarung tangan) Lepaskan baju yang terkontaminasi Jika tertelan jangan merangsang muntah Jika terpapar atau dikuatirkan segera hubungi dokter/tenaga medis | 3 | 2 | 6 |
| KETERANGAN | | | | | | |
| RESIKO – merupakan suatu nilai yang ditetapkan untuk menentukan suatu tingkatan dampak/ akibat berdasarkan keparahan yang disebabkan oleh kecelakaan kerja Le vel 1 : Tidak ada cedera, kerugian biaya rendah, kerusakan peralatan ringan Le vel 2 : Cedera ringan (hanya membutuhkan P3K), peralatan rusak ringan Le vel 3 : Menyebabkan cedera yang memerlukan perawatan medis kerumah sakit, peralatan rusak sedang Le vel 4 : Menyebabkan cedera yang menyebabkan cacatnya anggota tubuh permanen, peralatan rusak berat Le vel 5 : Menyebabkan korban jiwa (kematian), peralatan rusak berat | | | PELUANG – merupakan suatu nilai yang ditetapkan untuk menentukan tingkat frekuensi terhadap kejadian kecelakaan kerja Le vel 1 : Hampir tidak pernah terjadi Le vel 2 : Frekuensi kejadian jarang terjadi waktu tahunan Le vel 3 : Frekuensi kejadian sedang dalam waktu bulanan Le vel 4 : Hampir 100 % terjadi kejadian tersebut Le vel 5 : 100 % kejadian pasti terjadi | | | |
| TINGKAT BAHAYA – merupakan hasil perkalian dari Resiko (R) dan Peluang (P) sebagai tetapan tingkat bahaya dari suatu pekerjaan yang dilakukan SK 1-4 Renda Masih dapat ditoleransi O h R : 5-10 Sedan Dikendalikan sampai batas toleransi g | | | | | | |

| | | | |
|---|--------------------------------------|--|---|
| 11- Tinggi Pemantauan intensif dan pengendalian 25 i | | | |
| | disusun oleh : Mahasiswa Peneliti | telah diperiksa oleh : Pembimbing Utama | telah disetujui oleh : Ketua Jurusan |
| Tanggal | Februari 2020 | Februari 2020 | Februari 2020 |
| TandaT angan | | | |
| Nama | Maghfiroh Nur Laili | Dr. Akyunul Jannah, S. Si, M.P | Elok Kamilah Hayati, M.Si |
| NIM/ NIP | NIM.14630026 | NIP.19750410 200501 2 009 | NIP.19790620 200604 2 002 |