

**PENGARUH SUHU DAN VOLUME ENZIM TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

**Oleh:
DIMITRI ANGGITA WIBOWO
NIM. 15630112**



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

**PENGARUH SUHU DAN VOLUME ENZIM TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

**Oleh:
DIMITRI ANGGITA WIBOWO
NIM. 15630112**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains Dan Teknologi
Universitas Islam Negerimaulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

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

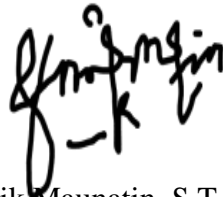
**PENGARUH SUHU DAN VOLUME ENZIM TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

**Oleh:
DIMITRI ANGGITA WIBOWO
NIM. 15630112**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Pada Tanggal : 17 Desember 2021

Pembimbing I



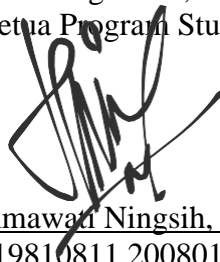
Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248

Pembimbing II



Ahmad Abtokhi, M.Pd
NIP.19761003 200312 1 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi





Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

**PENGARUH SUHU DAN VOLUME ENZIM TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

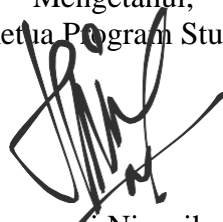
SKRIPSI

**Oleh:
DIMITRI ANGGITA WIBOWO
NIM. 15630112**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 17 Desember 2021

Penguji Utama	: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P NIDT. 19750410 200501 2 009	()
Ketua Penguji	: Suci Amalia, M.Sc NIDT. 19821104 200901 2 007	()
Sekretaris Penguji	: Anik Maunatin, S.T., M.P NIDT. 19760105 20180201 2 248	()
Anggota Penguji	: Ahmad Abtokhi, M.Pd NIP.19761003 200312 1 004	()

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dimitri Anggita Wibowo

NIM : 15630112

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Suhu Dan Volume Enzim Terhadap Aktivitas
Protease Yang Dihasilkan Oleh *Weissella Confusa*

Menyatakan dengan sebenar benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini bena-benar merupakan hasil penelitian saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil 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 atas perbuatan tersebut.

Malang, 22 Desember 2021



Dimitri Anggita Wibowo
NIM. 15630112

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah Robbil alamin,

Dengan penuh rasa syukur saya persembahkan hasil penelitian ini kepada

diri saya sendiri terimakasih telah melakukan yang terbaik dan

berusaha keras untuk menyelesaikannya

Kedua, untuk Bapak Sugeng, Ibu Lely, dan Mama Endang

terimakasih sudah menjadi orang tua yang sabar dan mendukung apa yang

diinginkan anaknya, terimakasih untuk selalu mendoakan dan

mejadi sumber motivasi saya. Kemudian, untuk ketiga saudara saya

Mas uki, Mbak Tiko, dan Adik Adhan yang selalu membuat saya bisa lebih

mengekspresikan diri.

MOTTO

*Kamu adalah orang terpenting dalam hidupmu,
So, Be Your Self Be Beautifull*

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT. atas rahmat, ridho serta hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian **“Pengaruh Suhu dan Volume Enzim Terhadap Aktivitas Protease yang Dihasilkan Oleh *Weissella confusa*”**. Sholawat dan salam semoga senantiasa tercurah pada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, beserta para sahabatnya, tabiin, tabiut tabiin dan orang-orang yang senantiasa mengikuti jalan mereka. Proposal ini disusun sebagai salah satu syarat pemenuhan tugas akhir. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu, diantaranya:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A. selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Rahmawati, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Anik Maunatin, S.T., M.P dan Ahmad Abtokhi, M.Pd selaku dosen pembimbing
4. Seluru dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman dan wawasan sebagai pedoman dan bekal bagi penulis
5. Seluru mahasiswa kimia khususnya Kelas C angkatan 2015 dan tim Laboratorium Biokimia yang telah berbagi informasi dan masukan kepada penulis dalam menyelesaikan laporan hasil penelitian ini

6. Serta pihak-pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan laporan hasil penelitian ini

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna. Oleh karena itu, diharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun semoga proposal ini bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Malang, Desember 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
Abstrak.....	xiv
Abstrac	xv
مستخلص البحث.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan	5
1.4 Batasan Masalah	5
1.5 Manfaat	5
BAB II DASAR TEORI.....	6
2.1. Bakteri Proteolitik.....	6
2.2. Enzim Protease	7
2.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim.....	8
2.3.1 Suhu	8
2.3.2 pH	9
2.3.3 Volume Enzim dan Substrat	9
2.3.4 Senyawa Aktivator dan Inhibitor	10
2.4. Bakteri Asam Laktat	10
2.4.1 <i>Weissella confusa</i>	12
2.5. Uji Aktivitas Protease	13
2.6. Spektroskopi UV-Vis.....	14
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan	16
3.3 Rancangan Penelitian.....	17
3.4 Tahapan Penelitian.....	17
3.5 Pelaksanaan Penelitian	18
3.5.1 Preparasi Alat Dan Bahan	18

3.5.2 Pembuatan Media.....	18
3.5.2.1 Media <i>Skim Milk Borth</i> (SMB)	18
3.5.2.2 Media <i>De Man Rogosa Sharpe Agar</i> (MRSA)	18
3.5.2.3 Media <i>De Man Rogosa Sharpe Broth</i> (MRSB)	18
3.5.3 Regenerasi dan Pembuatan Inokulum Bakteri <i>Weissella confusa</i>	19
3.5.4 Uji Aktivitas Protease oleh <i>Weissella confusa</i> Secara Kualitatif.....	19
3.5.5 Produksi Enzim Protease dari <i>Weissella confusa</i>	20
3.5.6 Uji Aktivitas Protease Kasar	21
3.5.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	21
3.5.6.1 Pembuatan Kurva Standart Tirosin	21
3.5.6.3 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	21
3.5.6.4 Pengaruh Volume Enzim Terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	22
3.6 Analisis Data.....	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Pembuatan Media	24
4.2 Regenerasi dan Pembuatan Inokulum Bakteri <i>Weissella confusa</i>	25
4.3 Uji Aktivitas Enzim Protease Secara Kualitatif.....	27
4.4 Produksi Enzim Protease yang Dihasilkan oleh <i>Weissella confusa</i>	28
4.5 Kurva Standart Tirosin.....	29
4.6 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease	30
4.7 Pengaruh Volume Enzim Terhadap Aktivitas Enzim Protease	32
4.8 Pemanfaatan Enzim Protease Dalam Perspektif Islam	34
BAB V PENUTUP.....	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Suhu.....	30
Tabel 4.2	Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Volume Enzim.....	33
Tabel L.1	Indeks Protease dari Masing-Masing Isolat	51
Tabel L.2	Kurva Standart Tirosin.....	53
Tabel L.3	Aktivitas Protease pada Berbagai Suhu.....	55
Tabel L.4	Aktivitas Protease pada Berbagai Volume Enzim	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1	Pengukuran Zona Bening Bakteri <i>Weissella confusa</i>	20
Gambar 4.1	a) Media MRSA; b) Media MRSB; c) Media SMB.....	24
Gambar 4.2	(a) Hasil Regenerasi Isolat Bakteri <i>Weissella confusa</i> pada Media MRSA (b) Inokulum Bakteri <i>Weissella confusa</i> pada Media MRSB.....	26
Gambar 4.3	Uji Kualitatif Enzim Protease yang Dihasilkan Bakteri <i>Weissella confusa</i>	27
Gambar 4.4	Kurva Standar Tirosin	29
Gambar 4.5	Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Suhu	31
Gambar 4.7	Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Konsentrasi Enzim ...	33
Gambar L.1	Kurva Standar Tirosin	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	43
Lampiran 2 Skema Kerja	43
Lampiran 3 Pembuatan Media dan Reagen	48
Lampiran 4 Perhitungan.....	51
Lampiran 5 Dokumentasi.....	69

ABSTRAK

Wibowo, Dimitri A. 2021. **Pengaruh Suhu dan Volume Enzim Terhadap Aktivitas Protease yang Dihasilkan Oleh *Weissella confusa***. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Anik Maunatin, S.T., M.P; PembimbingII: Ahmad Abtokhi, M.Pd.

Kata Kunci: Bakteri Proteolitik, Enzim Protease, BAL, *Weissella confusa*

Bakteri proteolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim protease. Enzim protease yang diproduksi didalam sel akan dilepaskan keluar sel untuk mendegradasi protein. Bakteri yang dapat menghasilkan enzim protease salah satunya adalah bakteri asam laktat (BAL). *Weissella confusa* merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan enzim protease. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh suhu dan volume enzim terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*. Aktivitas protease diukur secara kuantitatif menggunakan metode Bergmeyer dan Grassal (1983) dengan variasi suhu 30°C, 40°C, 50°C, 60°C dan diuji menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 753,9 nm. Aktivitas enzim protease optimum dari *Weissella confusa* pada suhu 40°C dengan nilai $9,7322 \times 10^{-3}$ U/mL. Suhu dengan aktivitas terbaik digunakan untuk uji aktivitas proteolitik pada volume enzim 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL. Aktivitas enzim protease menunjukkan nilai tertinggi pada volume enzim 0,5 mL dengan nilai $1,5921 \times 10^{-2}$ U/mL.

ABSTRACT

Wibowo, Dimitri A. 2021. **Effect of Temperature and Enzyme Volume on Protease Activity Produced by *Weissella confusa***. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: Anik Maunatin, S.T., M.P; Advisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd.

Keyword: Proteolytic bacteria, Protease enzymes, BAL, *Weissella confusa*

Proteolytic bacteria is bacteria that has the ability to produce protease enzymes. Protease enzymes that were produce in cells will be released outside the cells to degrade proteins. One of the bacteria that can produce the protease enzyme is lactic acid bacteria (LAB). *Weissella confusa* is a lactic acid bacteria that can produce protease enzymes. This research was conducted to determine the effect of temperature and enzyme concentration on protease activity produced by *Weissella confusa*. The protease activity was measured by Bergmeyer and Grassal method (1983) with variations in temperature of 30°C, 40°C, 50°C, 60°C and tested using a spectrophotometer at a wavelength of 753.9 nm. The optimum activity of *Weissella confusa* at a temperature of 40°C with a value of 9.7322×10^{-3} U/mL. The temperature with the best activity was used to test the proteolytic activity at 0.5 mL; 1.0 mL; 1.5 mL; 2.0 mL enzyme volume. The activity of the protease enzyme showed the highest value at a 0.5 mL enzyme concentration of 1.5921×10^{-2} U/mL.

مستخلص البحث

ويباوا، ديمتري أ. 2021 . تأثير درجة الحرارة وحجم الإنزيم على نشاط الإنزيم البروتيني الذي حصل عليه ويسلا كونفوسا (*Weissella confusa*). البحث العلمي. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: عانق معونة، الماجستير والمشرف الثاني: أحمد أبطحي، الماجستير.

الكلمات المفتاحية: بكتري بروتيليتيك، الإنزيم البروتيني، بكتريا حمض اللبنيك، ويسلا كونفوسا (*Weissella confusa*)

كان بكتريا بروتيليتيك بكتريا لها قدرة على إنتاج الإنزيم البروتيني. ثم يفصل الإنزيم البروتيني الذي تم إنتاجه في الخلية خارجها لتحلل البروتين. من البكتريات التي تحصل على الإنزيم البروتيني بكتريا حمض اللبنيك. فأما ، ويسلا كونفوسا (*Weissella confusa*) فهي بكتريا حمض اللبنيك التي يمكن لها أن تحصل على الإنزيم البروتيني. وهذا البحث تم القيام به لمعرفة . تأثير درجة الحرارة وحجم الإنزيم على نشاط الإنزيم البروتيني الذي حصل عليه ويسلا كونفوسا (*Weissella confusa*). فتقاس أنشطة الإنزيم البروتيني باستخدام طريقة بيرغمير وغراسال (Bergmeyer dan Grassal) (1983) بأنواع درجات الحرارة 30°ج ، 40°ج ، 50°ج ، 60°ج وسيتم تجريبها باستخدام مقياس الطيف الضوئي بطول موجة 753,9 نانو متر. فتوجد أنشطة الإنزيم البروتيني الأمثل من ويسلا كونفوسا (*Weissella confusa*) في درجة الحرارة 40°ج بنتيجة $9,7322 \times 10^{-3}$ ملي لتر. فكانت درجة الحرارة بنشاط أحسن تستخدم لتجربة بكتريا بروتيليتيك بحجم الإنزيم 0,5 ميلي لتر: 1,0 ميلي لتر: 1,5 ميلي لتر: 2,0 ميلي لتر. تدل أنشطة الإنزيم البروتيني على قيمة أعلى بحجم الإنزيم 0,5 ميلي لتر حجمه $1,5921 \times 10^{-2}$ ميلي لتر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan katalis yang sangat efisien dalam pengubahan substrat menjadi produk. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim memiliki energi aktivasi yang lebih rendah, sehingga membutuhkan lebih sedikit waktu untuk membentuk produk (Pelezar dan Chan, 2005). Enzim dapat diisolasi dari beberapa sumber diantaranya tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan atau hewan sebagai sumber dari enzim memiliki keterbatasan jumlah dikarenakan pertumbuhan dari keduanya membutuhkan waktu yang relatif lama. Menggunakan mikroorganisme sebagai sumber enzim memiliki beberapa kelebihan diantaranya dapat tumbuh pada substrat yang ekonomis, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik (Yuniati dkk., 2015), serta kondisi produksi yang tidak tergantung pada musim dan waktu proses produksi (Poernomo, 2003).

Protease merupakan enzim yang berfungsi mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein (Puspitasari dkk, 2012). Menurut Gupta (2002) enzim protease serin alkali dari *Bacillus subtilisin* memiliki daya hidrolisis protein sangat tinggi sebagai komponen untuk detergen. Selain itu, dalam bidang kesehatan protein diperlukan untuk membawa kalsium yang terikat pada protein dalam darah, kekurangan protease dapat menyebabkan artritis, osteoporosis dan penyakit-penyakit lain yang berkaitan dengan kekurangan kalsium (Yati dkk., 2011). Menurut Yusriah dan Kuswytasari (2013) bakteri proteolitik banyak

digunakan industri produk kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, produk-produk makanan, maupun pengolahan limbah industri.

Menurut Hardiningsih., dkk (2006) bakteri asam laktat tidak bersifat patogen sehingga aman jika digunakan pada industri pengawetan makanan dan minuman. BAL dapat menghasilkan enzim seperti protease, α -amilase, fitase, kitinase dan lipase. Sistem proteolitik pada bakteri asam laktat bersifat kompleks yang berperan pada pembentukan *flavour* dan meningkatkan jumlah peptida dan asam amino bebas dalam produk fermentasi (Piraino dkk., 2008). Peran besar dari bakteri dalam proses enzimatik ini sesuai dengan sabdah Allah SWT dalam Q.S Ali Imran (3) ayat 191 bahwa segala sesuatu yang diciptakan tidak ada yang sia-sia.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بٰطِلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ - ١٩١

Artinya: “(Yaitu) Orang-orang yang mengingat Allah SWT sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tidaah engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka.”” Q.S Ali Imran (3): 191.

Ayat di atas menjelaskan bahwa bagi manusia yang selalu berfikir tentang penciptaan langit dan bumi akan memahami bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di dunia ini dengan manfaatnya masing-masing. Menurut Al-Jazairi (2008) lafadz هٰذَا بٰطِلًا رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ bermaksud bahwa Allah SWT tidak menciptakan segala sesuatunya dengan sia-sia tanpa adanya hikmah dan tujuan apapun. Dibalik sesuatu yang dianggap merugikan terkandung manfaat yang mungkin belum diketahui, dengan penelitian ini dapat diketahui bahwa bakteri yang

sering dianggap merugikan memiliki banyak manfaat. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bahwa bakteri *Weissella confusa* memiliki kemampuan memproduksi enzim protease.

Genus *Weissella* merupakan Gram-positif, katalase-negatif, non-endospora dan merupakan BAL berbentuk batang (Kamboj, 2015). Bakteri jenis *Weissella* dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti tanah, sayuran segar, daging, ikan, silase yang difermentasi dan makanan yang difermentasi (Björkroth dkk., 2002). *Weissella confusa* merupakan salah satu spesies *Weissella* yang penyebarannya paling luas dalam makanan, strain spesies ini telah terbukti bertindak sebagai probiotik dan berteknologi (Fusco, 2011). Aktivitas proteolitik bakteri *Weissella confusa* bersifat stabil terhadap suhu tinggi dan kondisi asam (Tenea dkk., 2018). Menurut Fusco., dkk (2015) bakteri *Weissella confusa* yang diisolasi dari berbagai sumber makanan diketahui menghasilkan berbagai produk seperti asam laktat, peptide antibakteri (bakteriosin) dan eksopolisakarida. Dubey dan Kadirvelu (2018) menyatakan bahwa bakteriosin yang dihasilkan dari *Weissella confusa* AJ79 ditemukan aktif dan stabil pada suhu dan pH yang berbeda, sensitive terhadap enzim proteolitik, stabil dengan deterjen yang berbeda dan dapat menghambat sejumlah besar varietas mikroorganisme patogen.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim di antaranya adalah suhu, pH, konsentrasi substrat dan enzim yang digunakan, waktu inkubasi serta aktivator dan inhibitor (Hames dan Hoper, 2005). Enzim membutuhkan sejumlah panas untuk dapat aktif, oleh karena itu suhu sangat mempengaruhi aktivitas suatu enzim. Aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat seiring dengan peningkatan

suhu sebesar 10°C, hingga mencapai titik optimum. Peningkatan suhu diatas titik optimum akan menyebabkan enzim mengalami denaturasi (Pratiwi, 2008).

Haq dan Mukhtar (2006) menyatakan isolat *Lactobacillus paracasei* memiliki aktivitas protease terbaik pada suhu 35°C yaitu sebesar 7,28 U/mg. Bakteri *Weissella confusa* dapat hidup pada rentan suhu 25, 35, 42 °C (Olano dkk., 2001). Menurut Shukla dan Arun (2011) aktivitas maksimum yang ditunjukkan oleh bakteri *Weissella confusa* pada suhu 25°C yaitu 6.1 U/mL. Menurut Oke dan Onilude (2014) oleh BAL *Pediococcus acidilactici* menunjukkan aktivitas optimum pada volume ekstrak kasar enzim 2,5 mL yaitu sebesar 80 U/mL.

Aktivitas proteolitik merupakan faktor utama dalam strain bakteri asam laktat (Yusmarini. 2010), mengingat luasnya penggunaan bakteri *Weissella confusa* pada bidang bioteknologi perlu dilakukan pengamatan terhadap aktivitas proteolitiknya dalam berbagai keadaan. Berdasarkan faktor yang mempengaruhi kerja enzim suhu dan nilai pH menjadi salah satu faktor terbesar yang perlu diketahui. Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui pengaruh dari suhu dan volume enzim terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu:

1. Bagaimana pengaruh suhu terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*?
2. Bagaimana pengaruh volume enzim terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini untuk:

1. Untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*.
2. Untuk mengetahui pengaruh volume enzim terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada percobaan ini diantaranya:

1. Enzim protease berasal dari *Weissella confusa* hasil isolasi dari susu kacang tanah dari penelitian sebelumnya.
2. Variasi suhu yang digunakan diantaranya 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60°C.
3. Variasi volume enzim yang digunakan diantaranya 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL.
4. Metode uji aktivitas protease yang digunakan merupakan metode spektroskopi UV-Vis.

1.5 Manfaat

Mafaat yang diharapkan dari penelitian ini yaitu dapat memberikan informasi mengenai pengaruh dari suhu dan volume enzim terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*.

BAB II

DASAR TEORI

2.1 Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim protease secara ekstraseluler. Enzim protease yang diproduksi didalam sel akan dilepaskan keluar sel untuk mendegradasi protein (Puspitasari dkk., 2012). Degradasi protein yang dilakukan oleh enzim protease secara kualitatif dapat diidentifikasi dari terbentuknya zona bening disekitaran koloni yang tumbuh pada media padat yang mengandung kasein (Saidah, 2014). Berdasarkan cara degradasi protein, bakteri proteolitik digolongkan menjadi dua jenis yaitu bakteri eksopeptidase dan endopeptidase. Bakteri eksopeptidase merupakan bakteri yang memecah protein dari arah luar dan menghasilkan asam amino. Bakteri endopeptidase memecah protein dari arah dalam dan menghasilkan polipeptida (Toha, 2001).

وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ إِلَّا عَلَى اللَّهِ رِزْقُهَا وَيَعْلَمُ مُسْتَقَرَّهَا وَمُسْتَوْدَعَهَا ۗ كُلٌّ فِي كِتَابٍ مُبِينٍ - ٦

Artinya: *“Dan tidak satupun makhluk bergerak (bernyawa) di bumi melainkan semuanya dijamin Allah rezekinya. Dia mengetahui tempat kediamannya dan tempat penyimpanannya. Semua (tertulis) dalam Kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)”*. Q.S Hud (11): 6

Q.S Hud (11) ayat 6 menjelaskan bahwa Allah SWT memberi dan menjamin rezki kepada setiap makhluk ciptaan-Nya. Allah SWT mengetahui tempat berdiamnya makhluk, baik ketika hidup maupun setelah matinya. Semuanya tersebut telah ditulis dalam kitab yang nyata, kitab yang berisi qadha yang telah ditentukan (Al-Qarni, 2007). Kehidupan seluruh makhluk dimuka bumi

telah ditentukan oleh takdir Allah SWT, tidak ada satupun makhluk yang terlupakan. Kemampuan menghidrolisis protein yang berada dalam substrat dan menjadikannya untuk kelangsungan hidupnya merupakan salah satu bentuk rezki yang diberikan Allah SWT pada bakteri proteolitik.

Hidrolisis protein merupakan reaksi penambahan-penghilangan, dimana protease bertindak sebagai nukleofili atau bereaksi dengan membentuk satu molekul air. Hidrolisis protein dalam sel eukariotik terdiri dari dua tahap. Tahapan pertama yaitu protein mengalami modifikasi oksidatif untuk menghilangkan aktivitas enzimatik. Tahapan kedua adalah penyerangan protease yang berfungsi untuk mengkatalisis degradasi protein (Toha, 2001). Hidrolisis suatu protein sebagai makromolekul bertujuan untuk menganalisis senyawa atau komponen penyusunnya. Komponen penyusun dari protein diantaranya adalah peptide sebagai sub makromolekul, asam amino sebagai unit molekul, dan C, H, O, N, S, P, Fe, Cu, Zn, dan I sebagai komponen unsur kimianya (Hawab, 2004).

2.2 Enzim Protease

Protease merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis protein menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti polipeptida dan asam amino (Deng dkk., 2010). Enzim protease dapat diisolasi dari tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan sebagai penghasil protease sangat terbatas, karena membutuhkan peralatan berat untuk menghancurkan jaringan tanaman yang besar dan keras (Lehninger, 2005) dan lamanya waktu tumbuh tumbuhan. Produksi protease menggunakan hewan juga terbatas karena kurangnya ketersediaan ternak penghasil enzim. Produksi enzim protease menggunakan

mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya yang lebih cepat, ekonomis, dan dapat ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik (Yuniati dkk., 2015).

Enzim protease terdiri dari berbagai jenis, berdasarkan jenis residu asam amino dalam sisi aktifnya dibedakan menjadi empat golongan. Pertama, protease serin memiliki residu serin pada gugus aktifnya dan bersifat endopeptidase. Contoh dari protease serin yaitu, tripsin, kimotripsin, dan subtilin. Kedua, protease sulfhidril yang memiliki residu sulfhidril pada gugus aktifnya. Contoh dari protease sulfhidril yaitu papain dan bromielin. Ketiga, protease karboksil memiliki dua gugus karboksil pada gugus aktifnya, kereaktifan gugus karboksil dapat dihambat oleh *p*-bromo fenasilbromida. Contoh dari protease karboksil adalah pepsin dan renin (Cuesta dkk., 2015). Keempat, protease logam memiliki residu logam pada gugus aktifnya, kereaktifan dari protease ini dipengaruhi oleh keberadaan logam dan dihambat oleh EDTA. Contoh dari protease logam adalah enzim peptidase (Choliq. 2008).

2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Kemampuan enzim protease dalam menghidrolisis protein dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya suhu, volume enzim dan substrat, pH, adanya senyawa inhibitor dan aktivator (Pratiwi. 2008).

2.3.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja enzim, hal ini dikarenakan enzim membutuhkan sejumlah panas untuk dapat aktif. Peningkatan

suhu menyebabkan meningkatnya aktivitas enzim hingga titik optimum. Peningkatan suhu lebih dari suhu optimumnya menyebabkan ikatan pada enzim melemah dan akan terdenaturasi (Pratiwi. 2008). Menurut Shukla dan Arun (2011) bakteri *Weissella confusa* mencapai aktifitas optimum pada suhu 25°C. Menurut Kajala., dkk (2015) aktivitas enzim pada *Weissella confusa* 392-rDSR mengalami peningkatan dari suhu 25°C hingga 35°C, kemudian mengalami penurunan pada suhu 40°C.

2.3.2 pH

pH lingkungan berpengaruh terhadap kecepatan enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Konsentrasi ion hidrogen pada saat reaksi mempengaruhi struktur tiga dimensi dari enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki kondisi pH optimum masing-masing yang menjadi kondisi paling kondusif dari enzim untuk mengikat substrat (Leninger 2005). Perubahan konsentrasi ion hidrogen dapat menyebabkan enzim terdenaturasi, karena adanya gangguan terhadap interaksi non-kovalen yang menjaga kestabilan struktur tiga dimensi enzim (Baehaki dkk., 2005). Menurut Kajala., dkk (2015) pH optimum untuk aktivitas enzim *Weissella confusa* 392-rDSR adalah 5,4. Amari., dkk (2013) menyatakan bahwa bakteri *Weissella confusa* yang diisolasi dari gandum *sourdough* menunjukkan aktifitas pada pH 3,5-7,5.

2.3.3 Volume Enzim dan Substrat

Hubungan antara volume enzim dan substrat pada reaksi enzimatik yaitu, bila konsentrasi substrat tetap maka kenaikan laju reaksi berbanding lurus dengan volume enzim, sedangkan bila volume enzim yang tetap, maka kenaikan laju reaksi

berbanding lurus dengan konsentrasi substrat (Pratiwi, 2008). Konsentrasi substrat yang rendah akan menyebabkan enzim tidak dapat mencapai kondisi optimal. Meningkatnya konsentrasi substrat berbanding lurus dengan meningkatnya kecepatan reaksi. Kecepatan maksimum (V_{maks}) suatu reaksi mengakibatkan enzim menjadi jenuh oleh substratnya sehingga tidak dapat meningkatkan laju reaksi (Baehaki dkk., 2005).

2.3.4 Senyawa Aktivator dan Inibitor

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh ion logam, ion logam ini dapat berperan sebagai aktivator atau inhibitor. Senyawa aktivator dan inhibitor bekerja saling berlawanan. Senyawa aktivator merupakan senyawa yang dapat menyebabkan peningkatan laju reaksi. Senyawa inhibitor yang ditambahkan pada reaksi enzimatik dapat menurunkan laju reaksi. Peningkatan dan penurunan laju reaksi diakibatkan ion logam dapat bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga. Aktivator maupun inhibitor dapat berikatan dengan sisi aktif enzim dikarenakan memiliki struktur tiga dimensi yang mirip dengan substrat (Pratiwi 2008). Ion logam yang dapat bertindak sebagai aktivator atau inhibitor pada reaksi enzimatik diantaranya, Ca, Mg, Zn, dan Fe (Emmanuelle, 2013).

2.4 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang atau kokus, tidak motil, tidak menghasilkan spora, bersifat katalase negatif, tahan terhadap kondisi asam, dan bersifat anaerob fakultatif (Hutkins, 2006). BAL

merupakan sumber bermacam-macam enzim seperti enzim proteolitik, peptidolitik, glikosidase, pendegradasi polisakarida, urease, malolaktik, fenoloksidase, dan lipase (Matthews, 2004). BAL dikenal sebagai bakteri yang menguntungkan, dan aman untuk dikonsumsi. Penggunaan bakteri asam laktat pada makanan diantaranya pada produksi tempe, tahu, kecap, yoghurt, mentega dan keju (Mutia, 2013). Pemanfaatan lain dari BAL diantaranya sebagai antimikroba, antikolesterol, efek stimulasi imun, meningkatkan penyerapan laktosa oleh tubuh, mencegah diare, dan aktivitas antimutagenik sehingga dapat mencegah penyakit kanker (Surono, 2004). BAL diklasifikasikan menjadi beberapa genus berdasarkan perbedaan morfologi, jenis fermentasi glukosa, perbedaan suhu pertumbuhan, produksi asam laktat, kemampuan untuk tumbuh pada konsentrasi garam tinggi, dan toleransi terhadap asam, basa, serta garam (Axelsson, 2004).

Berdasarkan jalur fermentasi yang utama, BAL dibedakan menjadi dua jenis yaitu, homolaktat (homofermentatif) dan heterolaktat (heterofermentatif). BAL Fermentasi homolaktat (homofermentatif) merupakan metabolisme menghasilkan sejumlah besar asam laktat pada kondisi standar (Axelsson, 2004). Fermentasi jenis ini terjadi pada kondisi glukosa yang banyak dengan oksigen yang terbatas. Contoh BAL yang melakukan metabolisme jenis ini diantaranya adalah, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, dan *Pediococcus* (Suwardana, 2007). BAL heterolaktat (heterofermentatif) selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan karbondioksida, alkohol, ester dan beberapa jenis asam volatil lainnya dalam jumlah yang sedikit (Axelsson, 2004). BAL yang melakukan metabolisme jenis ini diantaranya adalah bakteri *Loeconostocs*, beberapa *Lactobacilli*, *Oenococci*, dan *Weisella* (Suwardana, 2007).

2.4.1 *Weissella confusa*

Weissella merupakan bakteri jenis Gram-positif, katalase-negatif, dan non-endospora berbentuk batang. *Weissella* sering salah diidentifikasi sebagai *Lactobacillus spp.* atau organisme mirip *Lactobacillus* oleh metode identifikasi fenotip tradisional dan komersil (Kamboj, 2015). Bakteri jenis *Weissella* dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti tanah, sayuran segar, daging, ikan, silase yang difermentasi dan makanan yang difermentasi (Björkroth dkk., 2002). Spesies *Weissella* yang telah teridentifikasi dengan baik, diantaranya spesies *W. confusa*, *W. beninensis*, *W. ceti*, *W. cibaria*, *W. diestrammenae*, *W. fabalis*, *W. fabaria*, *W. ghanensis*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. minor*, *W. oryzae*, *W. paramesenteroides*, *W. soli*, *W. thailandensis*, *W. uvarum*, *W. Viridescens* (Fusco, 2015). *Weissella confusa* menjadi salah satu spesies *Weissella* yang penyebarannya paling luas dalam makanan (Fusco, 2011), hal ini dikarenakan sifatnya dinilai aman untuk tubuh manusia dibandingkan spesies lainnya (Sturino, 2018). Potensi *Weissella confusa* selain dalam bidang fermentasi makanan yaitu sebagai antibakteri dan efisiensi anti-inflamasi (Dey dkk., 2019), bakteri ini juga berpotensi sebagai probiotik (Lee dkk., 2012).

Weissella confusa merupakan salah satu spesies *Weissella* yang memiliki aktivitas proteolitik. Sistem protease dan peptidase yang kompleks pada BAL memungkinkan mereka menggunakan kasein sebagai sumber asam amino dan nitrogen (Tulini dkk., 2015), aktivitas proteolitik dapat menyebabkan pembentukan peptida dengan sifat bioaktif sebagai anti mikroba dan anti hipertensi (Korhonen, 2009). Menurut Sharma., dkk (2018) *Weissella confusa* memiliki kemampuan

mendegradasi kasein dan menunjukkan adanya aktivitas proteolitik meskipun tidak menunjukkan aktivitas amilolitik dan lipolitik. *Weissella confusa* dapat hidup pada suhu 25-42°C (Olano dkk., 2001). Lee., dkk (2012) dan Abushelaibi., dkk (2017) melaporkan toleransi spesies *Weissella confusa*, *Weissella cibaria* dan *Lactobacillus* hingga 60°C. Bakteri *Weissella confusa* yang berhasil diisolasi dari gandum *sourdough* menunjukkan aktifitas pada suhu 25-50°C dan pada pH 3,5-7,5 (Amari dkk., 2013). Menurut Shukla dan Arun (2011) aktivitas maksimum yang ditunjukkan oleh bakteri *Weissella confusa* pada suhu 25°C dan pH 5,4 sebesar 6.1 U/mL.

2.5 Uji Aktivitas Protease

Aktivitas protease ditentukan dengan mengukur kadar asam amino sebagai hasil hidrolisis protein dalam substrat oleh enzim protease (Soeka dan Sulistyani, 2014). Aktivitas enzim protease diukur dengan menggunakan metode Bergmeyer dan Grassal (1983) yang menggunakan kasein sebagai substratnya. Prinsip kerja dari metode bergmeyer dan Grassal (1983) yaitu pengukuran asam amino dari tirosin yang terhidrolisis dan dipisahkan dari kasein. Enzim protease menghidrolisis kasein dibantu oleh air menjadi asam amino dan peptida. Laju pembentukan peptide menjadi tolak ukur terhadap nilai aktivitas katalis protease. Setelah itu, substrat yang telah dihidrolis ditambahkan asam trikloroasetat (TCA)

Penambahan TCA berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik. Asam trikloroasetat merupakan agen pengendap protein yang baik dan konsentrasi 10 % asam trikloroasetat dapat mengendapkan protein dengan maksimal (Rajalingnam, dkk., 2009). Pemisahan asam amino dan peptida dibantu dengan sentrifugasi untuk

mempercepat proses pemisahan. Kemudian, filtrat yang didapat ditambahkan Na_2CO_3 untuk mengikat air yang tersisa pada larutan. Penambahan Na_2CO_3 juga berfungsi untuk menaikkan pH larutan menjadi 11,5 yang merupakan pH optimum untuk intensitas dan stabilitas warna biru. Reagen *Folin Ciocalteu* yang ditambahkan akan berikatan dengan asam amino dan menyebabkan perubahan warna menjadi hijau kekuningan. Larutan diukur dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis (Bergmeyer dan Grassal, 1983).

2.6 Spektroskopi UV-Vis

Spektroskopi UV-Vis merupakan alat pengukur panjang gelombang dari intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel (Dachyanus, 2004). Sinar ultraviolet menyerap pada rentan panjang gelombang 200-400 nm sedangkan sinar tampak berada pada rentan panjang gelombang 400-800 nm (Elsair, 2012). Analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis terdiri dari analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Analisis kualitatif meliputi uji kemurnian spectrum UV-Vis dan penentuan panjang gelombang maksimum. Analisis secara kuantitatif meliputi penentuan konsentrasi sampel (Apratiwi, 2016). Spektrofotometer UV-Vis menggunakan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga sering digunakan pada analisis kuantitatif (Mulja dan Suharman, 2009).

Prinsip kerja dari Spektrofotometer UV-Vis adalah interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Radiasi elektromagnetik yang dipancarkan berupa partikel-partikel foton, energi foton berbanding terbalik dengan panjang gelombang. Molekul yang menyerap gelombang elektromagnetik menyebabkan

elektron tereksitasi dari keadaan dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Eksitasi elektron ini direkam dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang, absorbansi sesuai jenis elektronnya. Jadi semakin rendah energi yang dibutuhkan elektron untuk bereksitasi maka semakin besar panjang gelombang yang diabsorpsi (Suhartati, 2017).

Transisi electron terdiri dari beberapa jenis diantaranya adalah transisi energi $\sigma\text{-}\sigma^*$, $n\text{-}\sigma^*$, $\pi\text{-}\pi^*$, $n\text{-}\pi^*$. Transisi $\sigma\text{-}\sigma^*$ ini menghasilkan serapan panjang gelombang maksimum pada 150 nm. Transisi pada $n\text{-}\sigma^*$ menyerap pada panjang gelombang maksimal kecil 200 nm. Senyawa yang memiliki orbital σ merupakan merupakan senyawa organik jenuh yang tidak memiliki pasangan electron bebas (PEB). Kromofor merupakan tipe transisi elektron π yang menyebabkan transisi elektron $\pi\text{-}\pi^*$ dan $n\text{-}\pi^*$. Kromofor yang menyebabkan transisi $\pi\text{-}\pi^*$ menyerap pada panjang gelombang 200 nm, sedangkan kromofor yang menyebabkan transisi $n\text{-}\pi^*$ memberikan serapan pada maks 300 nm (Dachriyanus, 2004).

BAB III

METODELOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berjudul “**Pengaruh Suhu dan Volume Enzim Terhadap Aktivitas Protease yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa***” dilakukan pada bulan September 2020 di Laboratorium Biotek, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, *shaker inkubator*, timbangan analitik, *laminar Air Flow (LAF)*, *hot plate*, oven, *autoklaf*, kawat ose, *shaker*, *vortex*, *sentrifuge*, *spectrophotometer UV-Vis*, *Micropipet*, kertas sampul, plastic WRAP, kantong plastik tahan panas, cawan petri, bunsen dan korek api.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah strain bakteri *Weissella confusa* hasil isolasi dari susu kacang tanah, aquades, alcohol 70% untuk desinfektan, aluminium foil, *De Man Rogosa Sharpe Agar (MRSa)*, *De Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB)*, *Skim Milk Broth (SMB)*, *Skim Milk*, Na_2CO_3 0,5 M, tirosin, buffer fosfat pH 7, asam trikloroasetat (TCA), NaCl, reagen Folin, kertas label, tissue, kapas.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Penelitian secara deskriptif kualitatif yaitu dilakukan uji produksi enzim protease. Penelitian secara deskripsi kuantitatif terdiri dari 2 tahapan. Penelitian tahap pertama untuk mengetahui pengaruh variasi suhu 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60°C. Percobaan dilakukan pengulangan 3 kali dan hasil terbaik dari penelitian tahap I dilanjutkan pada tahap II. Penelitian tahap kedua yaitu variasi volume enzim yaitu 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL terhadap produksi enzim protease yang dihasilkan isolat bakteri *Weissella confusa*.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Tahap Preparasi Alat dan Bahan.
2. Pembuatan Media.
 - a. Media *Skim Milk Broth* (SMB).
 - b. Media *De Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA).
 - c. Media *De Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB).
3. Regenerasi dan Pembuatan Stok Isolat bakteri *Weissella confusa*.
4. Uji Kualitatif produksi protease oleh *Weissella confusa*.
5. Produksi Enzim Protease.
6. Uji Aktivitas Enzim Protease dengan Variasi Suhu yaitu 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60°C.
7. Uji Aktivitas Enzim Protease dengan Variasi Volume Enzim yaitu 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL.
8. Analisis Data.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan

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

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Media *Skim Milk Borth* (SMB)

SMB sebanyak 2,8 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berisi 200 mL aquades dan dipanaskan hingga larut. Media SMB yang sudah larut dimasukkan kedalam botol masing-masing 40 mL. Media kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.2.2 Media *De Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA)

MRSA sebanyak 6,82 gram dilarutkan pada 100 mL aquades. Dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Kemudian, disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media MRSA yang sudah steril ditambahkan 5 gram susu skim dan dipanaskan hingga laut.

3.5.2.3 Media *De Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB)

MRSB sebanyak 5,225 dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berisi 200 mL aquades dan dipanaskan hingga larut. MRSB yang sudah larut dimasukkan kedalam

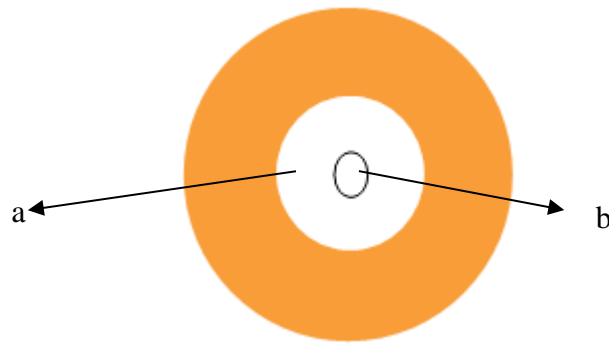
botol masing-masing 20 mL. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.3 Regenerasi dan Pembuatan Inokulum Bakteri *Weissella confusa*

Bakteri *Weissella confusa* diregenerasi pada media MRSA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Bakteri yang telah diregenerasi digunakan untuk pembentukan stok *Weissella confusa* dengan cara 5 ose biakan bakteri dipindahkan kedalam 20 mL media MSRB, kemudian di shaker pada kecepatan 110 rpm selama 18 jam pada suhu ruang. Inokulum diukur nilai OD (*Optical Density*)nya dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Nilai OD inokulum disetaraan menjadi OD 0,5.

3.5.4. Uji Aktivitas Protease oleh *Weissella confusa* Secara Kualitatif (Wikandari dkk., 2011)

Bakteri *Weissella confusa* dinokulasikan pada media MRSA-susu skim dengan komposisi 2% susu skim. Kemudian, diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Aktivitas bakteri penghasil protease yang berlangsung menghasilkan zona bening disekitar koloni. Selanjutnya, diukur diameternya dan ditentukan indeks protease (IP). Nilai indeks protease didapatkan dengan cara membagi diameter zona bening dengan diameter zona pertumbuhan bakteri. Perhitungan indeks protease adalah perbandingan luas area bening dengan luas koloni bakteri:



Gambar 3.1 Pengukuran Zona Bening Bakteri *Weissella confusa*

Rumus indeks protease : $\frac{a-b}{b}$ 3.1

Keterangan: a = diameter zona bening
b = diameter koloni

3.5.5 Produksi Enzim Protease dari *Weissella confusa* (Sutandi, 2003)

Inokulum kerja sebanyak 4 mL disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Kemudian pelet dipindahkan kedalam 40 ml media SMB dan diinkubasi kembali pada shaker selama 24 jam dalam suhu ruang. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

3.5.6 Uji Protease Kasar

3.5.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (Dina, 2012)

Panjang gelombang maksimum dicari dengan mengukur larutan tirosin dengan konsentrasi 20 mg/L pada panjang Gelombang 578-800 nm. Panjang gelombang yang

menghasilkan absorbansi tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

3.5.6.2 Pembuatan Kurva Standart Tirosin (Dina, 2012)

Tirosin sebanyak 0,01 gram 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 mL, 3 mL, 5 mL, 7 mL, dan 9 mL, masing-masing diencerkan sampai 10 mL, sehingga menghasilkan konsentrasi 10 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 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 reagen *Folin Ciocalteau* 2N sebanyak 0,5 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 753,9 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan linearnya.

3.5.6.3 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease (Karniati, 2015)

Campuran 1,0 mL enzim, 1,0 mL substrat dan 1,0 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 diinkubasi selama 60 menit pada suhu 30 °C, 40 °C, 50 °C, dan 60°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 mL 0,4 M asam trikoloasetat (TCA). Kemudian, diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambah dengan 2,5 ml Na_2CO_3 0,5 M, dipreinkubasi selama 10 menit. Reagen *Folin Ciocalteau* 2N ditambahkan sebanyak 0,5 mL kemudian dihomogenkan. Pengujian aktivitas proteolitik dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 753,9 nm sehingga diperoleh aktivitas proteolitik optimum pada suhu tertentu.

Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi optimum pengukuran (Sugiyono, 2008). Hasil absorbansi dikonversikan menjadi tirosin. Aktivitas enzim protease dihitung dengan rumus sebagai berikut (Nakanishi 1974; Khosim dan putra, 2010)

$$\text{Unit Aktivitas enzim} = \frac{[\text{tirosin}]}{BM} \times \frac{v}{pxq} \times fp \dots\dots\dots 3.2$$

Keterangan : v = volume total sampel (ml)

p = jumlah enzim (ml)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

3.5.6.4 Pengaruh Volume Enzim Terhadap Aktivitas Enzim Protease (Oke dan Onilude, 2014)

Campuran 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL enzim, 1,0 mL substrat dan 1,0 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 diinkubasi selama 60 menit pada suhu 40°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 mL 0,4 M asam trikoloasetat (TCA). Kemudian, diambil sebanyak 0,5 mL laturan, ditambah dengan 2,5 ml Na_2CO_3 0,5 M, dipreinkubasi selama 10 menit. Reagen *Folin Ciocalteau* 2N ditambahkan sebanyak 0,5 mL kemudian dihomogenkan. Pengujian aktivitas proteolitik dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 753,9 nm sehingga diperoleh aktivitas protease.

3.7 Analisis Data

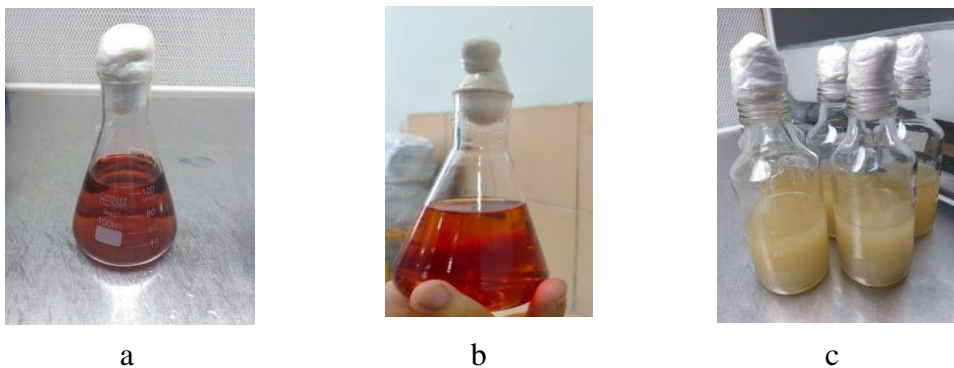
Data yang diperoleh dari penelitian ini yaitu aktivitas enzim dari tiga kali pengulangan percobaan. Pengolahan data dilakukan menggunakan metode deskriptif yang diinterpretasikan sesuai dengan hasil pengamatan yang ada.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Media

Media merupakan bahan biasanya digunakan untuk isolasi, regenerasi, pertumbuhan mikroba, serta sebagai tempat pengujian sifat-sifat fisiologi dan perhitungan jumlah koloni (Partic, 2008). Pembuatan media dilakukan secara aseptis dan harus disterilisasi untuk menghindari tumbuhnya kontaminan (Daisy, 2012). Media yang digunakan pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 4.1 yaitu *De Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), *De Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), dan *Skim Milk Broth* (SMB). Media MRSA dan MRSB digunakan untuk regenerasi dan pembuatan inokulum bakteri *Weissella confusa*, sedangkan media SMB digunakan pada produksi enzim protease.



Gambar 4.1 a) Media MRSA; b) Media MRSB; c) Media SMB

Media MRS merupakan media selektif yang biasa digunakan dalam pertumbuhan bakteri asam laktat (Subagiyo, 2015). Media selektif yang digunakan pada bakteri tertentu menunjukkan bahwa masing-masing bakteri

membutuhkan nutrisi yang berbeda. Perbedaan ini jika dikaitkan secara implisit dengan firman Allah dijelaskan dalam Al-Quran surat Al-A'la (87) ayat 2-3 yang berbunyi:

الَّذِي خَلَقَ فَسَوَّىٰ - ٢ وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ - ٣

Artinya: “ Yang menciptakan dan menyempurnakan (penciptaan-Nya) dan yang menentukan kadar (masing-masing) dan memberi petunjuk” Q.S Al-A'la(87):2-3

Menurut Abdullah (2003) ayat pertama bermaksud Allah SWT menciptakan seluruh makhluk yang ada dimuka bumi dan menyempurnakannya dalam bentuk yang sebaik-baiknya. Ayat kedua, menurut tafsir Al-Qarni (2007) bermaksud bahwa, dan juga memberikankemampuan makhluk-Nya sesuai dengan kadar masing-masing. Kemampuan hidup bakteri dalam suatu media tergantung pada ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan. Senyawa kompleks di dalam media tersebut akan dipecah menjadi senyawa yang lebih sederhana. Kemampuan bakteri ini merupakan petunjuk bahwa makhluk yang diciptakan-Nya sempurna dan memiliki kadarnya tersendiri.

4.2 Regenerasi dan Pembuatan Inokulum Bakteri *Weissella confusa*

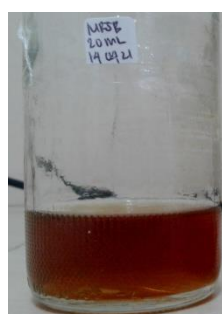
Regenerasi bakteri merupakan langkah penting yang bertujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri yang telah inaktif sehingga mampu bekerja secara maksimal. Bakteri inaktif menjadi kurang optimal jika digunakan dalam pembuatan inokulum (Zein, 2017). Isolat Bakteri *Weissella confusa* diregenerasi di dalam media MRSA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Regenerasi dilakukan secara aseptik agar tidak ada kontaminasi dari bakteri lain. Hasil dari regenerasi

ditunjukkan pada Gambar 4.2 (a) terlihat koloni berwarna putih. Isolat bakteri *Weissella confusa* hasil regenerasi akan digunakan untuk pembuatan inokulum.

Pembuatan inokulum dilakukan dengan cara menginokulasikan lima ose isolat pada media MRSB kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan 110 rpm selama 18 jam. Menurut Goh dan Koshy (2015) bakteri *Weissella confusa* telah mencapai fase eksponensial dalam waktu 18 jam. Sulistyaningtyas (2013) menyatakan bahwa bakteri yang berada pada fase eksponensial memiliki jumlah sel aktif yang maksimal. MRSB berisi inokulum akan mengalami perubahan warna setelah diinkubasi selama 18 jam dari bening menjadi keruh seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2 (b). Kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh, beregenerasi dan mensekresikan enzim pada media.



A



B

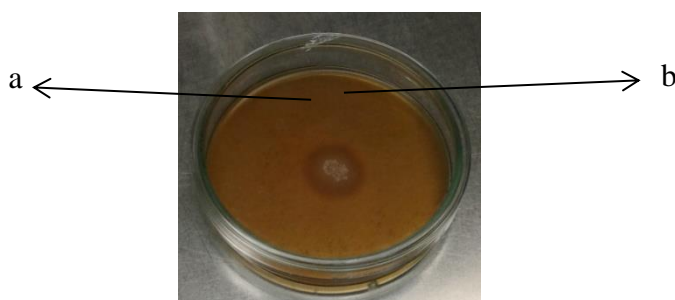
Gambar 4.2 (a) Hasil Regenerasi Isolat Bakteri *Weissella confusa* pada Media MRSB (b) Inokulum Bakteri *Weissella confusa* pada Media MRSB

Inokulum *Weissella confusa* yang telah diinkubasi selama 18 jam diukur nilai OD-nya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang yang digunakan berdasarkan warna komplementer pada media MRSB yaitu kuning hingga coklat (Febriyansari, 2008). Nilai absorbansi

yang didapat kemudian diatur kekeruhannya hingga setara dengan OD 0,5. Inokulum ini siap digunakan untuk produksi enzim protease.

4.3 Uji Aktivitas Enzim Protease Secara Kualitatif

Uji Produksi enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* secara kualitatif dilakukan terhadap isolat Bakteri *Weissella confusa* yang telah diremajakan. Tujuan dari proses ini yaitu untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim protease. Uji aktivitas enzim protease secara kualitatif dilakukan pada media MRSA yang ditambahkan 2% susu skim dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Susu skim yang ditambahkan pada media berperan sebagai sumber protein. Menurut Widhyastuti dan Naiola (2002) media yang cocok digunakan untuk seleksi bakteri proteolitik yaitu media yang mengandung susu skim dan agar. Protease yang dihasilkan oleh bakteri akan mendegradasi susu skim sehingga menyebabkan terbentuknya zona bening disekitar koloni (Adnan. 2017).



Gambar 4.3 Uji Kualitatif Enzim Protease yang Dihasilkan Bakteri *Weissella confusa*

Uji aktivitas secara kualitatif merupakan gambaran dari proses degradasi protein oleh bakteri proteolitik. Degradasi protein oleh protease menjadi asam amino menyebabkan perubahan warna putih menjadi tidak berwarna (Milala dkk.,

2016). Zona bening yang terbentuk pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa enzim protease yang dilepaskan oleh bakteri *Weissella confusa* menghidrolisis molekul protein yang berada pada susu skim. Menurut Irena (2010) hasil perombakan protein ditunjukkan dengan adanya zona bening yang menandakan protein telah dirombak menjadi senyawa peptida dan asam amino yang bersifat larut dalam media. Nilai indeks protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* sebesar 9. Besarnya aktivitas protease ditunjukkan dengan nilai indeks protease (IP) yaitu nilai dari perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri (Soeka dan Sulistiani, 2014).

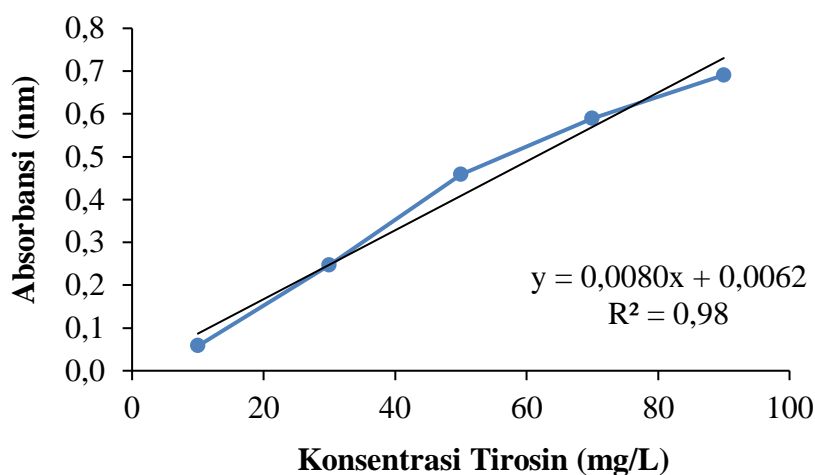
4.4 Produksi Enzim Protease yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa*

Enzim protease diproduksi dengan cara mensentrifugasi 4 mL inokulum OD 0,5 pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit untuk mengambil sel *Weissella confusa*. Sel hasil sentrifugasi dipindahkan kedalam 40 mL media produksi yaitu media SMB. Media produksi diinkubasi pada suhu ruang, dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Proses inkubasi dilakukan selama 24 jam karena bakteri sudah mencapai fase stasioner, dimana enzim protease telah diproduksi oleh *Weissella confusa*. Bakteri yang telah mencapai fase stasioner telah berhenti tumbuh, namun masih memungkinkan terjadi proses metabolisme dan mengakumulasikan produk salah satunya adalah enzim dalam cairan fermentasi.

Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Proses sentrifugasi dilakukan dengan tujuan memisahkan sel dan ekstrak kasar enzim. Filtrat hasil dari sentrifugasi merupakan enzim protease kasar yang akan digunakan dalam uji aktivitas secara kuantitatif.

4.5 Kurva Standart Tirosin

Pengukuran kurva standar dilakukan setelah dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur absorbansi dari salah satu konsentrasi larutan tirosin. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran pada larutan tirosin 20 mg/L pada panjang gelombang 578-800 nm. Hasil dari pengukuran panjang gelombang maksimum didapatkan puncak tertinggi pada panjang gelombang 753,9 nm. Panjang gelombang maksimum ini akan digunakan unjuk pengukuran kurva standart tirosin dan uji aktivitas enzim secara kuantitatif.



Gambar 4.4 Kurva Standar Tirosin

Kurva standart tirosin diperoleh dengan mengukur absorbansi larutan standart tirosin pada berbagai konsentrasi. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya yaitu 753,9 nm. Data konsentrasi dan hasil absorbansi dapat dilihat pada Tabel L.2. Setelah diperoleh data absorbansi dari larutan standart, data dioleh menjadi grafik hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi larutan standar dalam satuan mg/mL. Hubungan

antara konsentrasi tirosin dan absorbansi yang ditunjukkan pada Gambar 4.4 menghasilkan nilai $Y = 0,0080x + 0,0062$ dan $R^2 = 0,98$.

4.6 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease

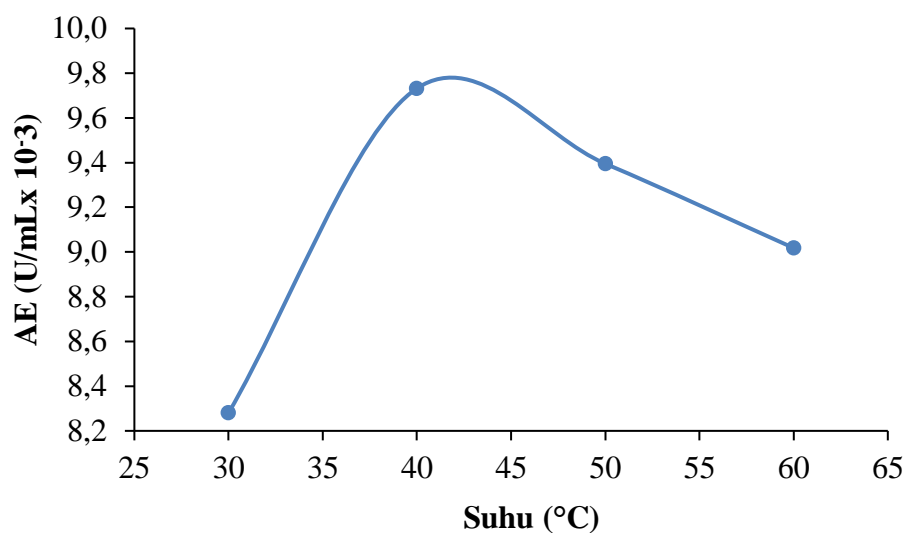
Uji aktivitas enzim protease pada berbagai suhu dilakukan untuk mengetahui suhu optimum dari bakteri *Weissella confusa* dalam menghasilkan enzim protease secara maksimal. Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan ekstrak kasar enzim yang didapat pada proses produksi enzim. Kasein sebagai yang akan dihidrolisis oleh protease diinkubasi pada diinkubasi pada berbagai suhu selama 60 menit. Asam amino hasil hidrolisis dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan asam trikloroasetat (TCA). Asam amino dan peptida akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang lebih berat akan mengendap. TCA juga berfungsi menginaktifkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease.

Tabel 4.1 Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Suhu

Suhu (°C)	Rerata Aktivitas Enzim (U/mL x 10 ⁻³)
30	8,2796
40	9,7322
50	9,3946
60	9,0178

Filtrat yang didapat ditambahkan Na₂CO₃ di preinkubasi selama 10 menit, Na₂CO₃ yang ditambahkan akan mengikat air yang tersisa pada larutan. Penambahan Na₂CO₃ juga berfungsi untuk menaikkan pH larutan menjadi 11,5 yang merupakan pH optimum untuk intensitas dan stabilitas warna biru. Reagen *Folin Ciocalteau* yang ditambahkan akan berikatan dengan asam amino dan

menyebabkan perubahan warna menjadi hijau kekuningan. Larutan diukur dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang 753,9 nm. Hasil pengukuran Aktivitas protease dari *Weissella confusa* pada berbagai suhu ditunjukkan pada Tabel 4.1.



Gambar 4.5 Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Suhu

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa terjadi kenaikan aktivitas enzim protease dari suhu 30°C sampai suhu 40°C kemudian mengalami penurunan aktivitas pada suhu 50°C hingga 60°C. Protease mencapai nilai aktivitas pada suhu 40°C yaitu sebesar $9,7322 \times 10^{-3}$ U/mL. Penurunan aktivitas enzim protease pada suhu 50°C menjadi $9,3946 \times 10^{-3}$ U/mL diduga disebabkan terjadinya denaturasi terhadap enzim sehingga reaksi enzimatik terganggu. Menurut Utari., dkk (2009) menyatakan bahwa penurunan aktivitas enzim akibat dikenai suhu yang melebihi dari suhu optimalnya disebabkan oleh perubahan konformasi enzim dan substrat, sehingga gugus aktif dari substrat tidak dapat lagi memasuki sisi aktif enzim.

Peningkatan suhu pada reaksi enzim dapat berpengaruh pada peningkatan laju reaksi atau peningkatan laju inaktivasi enzim. Enzim dapat bekerja optimal dalam

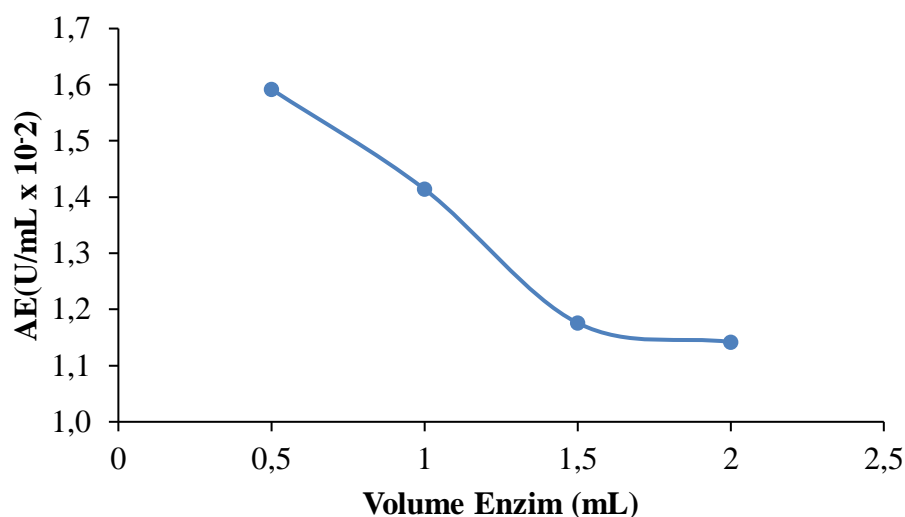
rentan suhu yang berbeda setiap jenisnya (Poedjiaji, 2006). Oke dan Onelude (2014) bakteri *Pedicoccus acidilactici* menghasilkan aktivitas optimum pada suhu 28°C. Sulthoniyah., dkk (2015) menyatakan bahwa bakteri *Lactobacillus plantarum* yang diisolasi dari pasta udang memiliki aktivitas optimum pada suhu 47°C sebesar 9,7619 U/mL. Peningkatan suhu sebesar 10°C dapat menyebabkan peningkatan aktivitas enzim sebanyak dua kali lipat hingga mencapai suhu optimum (Bintang, 2010).

4.7 Pengaruh Volume Enzim Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Volume enzim merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pada besarnya aktivitas enzim. Semakin banyak enzim yang tersedia maka semakin banyak pula ikatan yang terjadi antara enzim-substrat. Namun, pemberian enzim secara berlebih dapat menyebabkan enzim menjadi jenuh sehingga aktivitas enzim yang dihasilkan akan menurun (Baehaki dkk., 2005). Uji aktivitas enzim protease pada berbagai volume enzim dilakukan untuk mengetahui banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1mL kasein 1%. Uji aktivitas dilakukan dengan mereaksikan ekstrak kasar enzim dengan kasein sebagai substrat yang akan dihidrolisis dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 60 menit. Hasil pengukuran Aktivitas protease dari *Weissella confusa* pada berbagai konsentrasi enzim ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Volume Enzim

Volume Enzim (mL)	Rerata Aktivitas Enzim (U/mL x 10⁻²)
0,5	1,5921
1,0	1,4143
1,5	1,1759
2,0	1,1422

**Gambar 4.6 Aktivitas Enzim Protease pada Berbagai Volume enzim**

Gambar 4.6 menunjukkan hasil uji aktivitas enzim pada berbagai volume enzim menunjukkan hasil yang terus menurun seiring dengan penambahan volume enzim. Aktivitas enzim protease menunjukkan nilai tertinggi pada volume enzim 0,5 mL dengan sebesar $1,5921 \times 10^{-2}$ U/mL. Penurunan nilai aktivitas enzim protease seiring dengan penambahan volume enzim diduga karena enzim dengan volume 0,5 mL sudah cukup untuk mengikat 1 mL kasein 1%. Sehingga, ketika diberikan enzim dengan konsentrasi yang lebih tinggi enzim akan menjadi jenuh sehingga mengganggu reaksi enzimatik yang menyebabkan aktivitas enzim menurun. Aktivitas optimum enzim protease menurut Oke dan Onelude (2014) bakteri

Pedococcus acidilactici yaitu pada volume ekstrak kasar enzim 2,5 mL sebesar 80 U/mL.

4.8 Pemanfaatan Enzim Protease Dalam Perspektif Islam

Penelitian ini menunjukkan bahwa makhluk ciptaan Allah SWT selalu memiliki manfaat, walaupun sekecil apapun makhluk tersebut. Allah menjelaskan kekuasaanNya dalam menciptakan langit dan bumi serta segala sesuatunya dengan tujuannya masing masing.

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ۝ ٢٧

Artinya: *“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya dengan sia-sia. Itu anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang yang kafir itu karena mereka akan masuk neraka”*. (Q.S Shad (38) : 27)

Surat Shad (38) ayat 27 menjelaskan bahwa semua ciptaanya dilangit dan bumi memiliki manfaat bagi kehidupan manusia. Berdasarkan keimanannya manusia dapat mengambil manfaat dari setiap ciptaan-Nya dan celakalah bagi manusia yang menganggap bahwa hal-hal yang diciptakannya tidak memiliki tujuan. Bakteri diciptakan bermacam-macam jenis dengan manfaatnya masing-masing. Jenis bakteri salah satunya adalah jenis bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik menghasilkan enzim protease yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi protein. Peran bakteri sebagai agen pendegradasi dijelaskan pada Q.S Az-Zumar (75) ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنَابِيعٌ فِي الْأَرْضِ ۚ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُّخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ۚ ثُمَّ يَهْبِجُ فَتَرَاهُ مُمْصَقًا ۚ ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا ۚ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَذِكْرًا لِأُولَى الْأَلْبَابِ ۝ ٢١

Artinya: *“Apakah engkau memperhatikan, bahwa sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, lalu Dia mengalirkan menjadi mata air-mata air di bumi, kemudian mengeluarkan dengannya tanaman-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu ia menjadi kering, lalu engkau melihatnya kekuningan-kuningan, kemudian menjadikannya hancur. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat pelajaran bagi Ulil Albab”*. Q.S Az-Zumar (75): 21.

Surat Az-Zumar (75) ayat 21 menjelaskan tentang pemanfaatan makhluk mikroskopis seperti bakteri dalam proses dekomposisi/penghancuran bahan organik (Subandi, 2014). Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis protein menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti peptide dan asam amino. Kemampuan dalam mendegradasi protein ini dapat dimanfaatkan dalam berbagai industry. Aplikasi protease didalam industry sudah sangat luas, baik industry pangan maupun non-pangan. Pemanfaatan enzim protease dalam industri pangan biasa digunakan pada industri roti, keju, daging, bir. Pemanfaatan enzim protease pada industry non pangan dapat digunakan pada industry tekstil, detergendan pengolahan limbah (Nasciminto dan Martin. 2006). Menggunakan mikroorganisme dalam proses degradasi limbah protein dianggap lebih ramah lingkungan.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa* menunjukkan hasil yang optimum pada suhu 40°C yaitu sebesar $9,7322 \times 10^{-3}$ U/mL.
2. Aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa* menunjukkan hasil yang tertinggi pada volume enzim 0,5 mL yaitu sebesar $1,5921 \times 10^{-2}$ U/mL.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan waktu inkubasi dan volume enzim yang lebih rendah untuk mendapatkan nilai aktivitas yang lebih baik dari bakteri *Weissella confusa*.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan mengkaji faktor lain yang mempengaruhi aktivitas enzim diantaranya pH dan konsentrasi substrat untuk mengetahui optimasi aktivitas protease yang dihasilkan bakteri *Weissella confusa*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir* Jilid 2. Bogor: Pustaka Imam Asy-syafi'i.
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., dan Ayyash, M. (2017). Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Camel Milk. *LWT-Food Science and Technology* 79, 316-325.
- Al-Jazairi, Syaikh A. B. Jabir. 2008. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar* Jilid 2. Jakarta: Darus Sunnah.
- Al-Qarni, 'Aidh. 2007. *Tafsir Muyassar jilid 1*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qarni, 'Aidh. 2007. *Tafsir Muyassar jilid 4*. Jakarta: Qisthi Press.
- Amari. Myriam., Luisa Fernanda Gomez Arango., Valérie Gabriel., Hervé Robert., Sandrine Morel., Claire Moulis & Bruno Gabriel., Magali Remaud-Siméon., Catherine Fontagné-Faucher. 2013. Characterization of a novel dextranucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5413-5422.
- Apratiwi, N. 2016. Studi Penggunaan UV-Vis Spektroskopi untuk Identifikasi Campuran Kopi Luak dengan Kopi Arabika. *Skripsi*. Lampung: Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Lactic Acid Bacteria. *Microbiological and Functional Aspects Third edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Baehaki, A., dkk. 2008. Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen Ikan *Aeromonas hydrophilla*. *Buletin Teknologi dan Industri*. 19(1): 80-86.
- Bergmeyer, H. U., Grassaal, M. 1983. *Method of Enzymatic Analysis*. edv. ke 2. Weinheim: Verlag Chemie.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Björkroth KJ., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel WH., Korkeala HJ., Vandamme P. 2002. Taxonomic Study of *Weissella confusa* and Description of *Weissella Cibaria* Sp. Nov., Detected in Food and Clinical Samples. *Int. J. Syst. Evol. Microb* 52:141-148.
- Choliq, A. 2008. Aktivitas Enzim Protease dari *Mucor javanicus* yang Ditumbuhkan pada Media Tepung Singkong (*Manihot utilissima*). *Jurnal Mikrobiologi LIPI Bogor*. 3: 299 – 303.

- Cuesta, S.M., Rahman, S.A., Furnham, N., and Thornton, J.M. 2015. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*. 1: 1082 – 1086.
- Dachriyabus. 2004. Analisis Struktur Senyawa Organic Secara Spektroskopi. *Lembaga Pengembangan Teknologi Informasidan Komunikasi (LPTIK)*. Padang: Universitas Andalas.
- Daisy. 2012. *Autoklaf*. Penerbit Kanisius : Bandung.
- Deng, A., Wu, A., Zhang, Y., Zhang, G., and Wen, T. 2010. Purification and Characterization of a Surfactant-Stable High-Alkaline Protease from *Bacillus sp.* B001. *Journal of Bioresource Technology*. 1: 7100 – 7106.
- Dey, Debasish Kumar., Khan, Imran., Kang, Sun Chul. 2019. Anti-Bacterial Susceptibility Profiling of *Weissella Confusa* DD_7 Against The Multidrug-Resistant ESBL-positive *E.coli*. *Microbial Pathogenesis*. 128: 199-130.
- Dina, Wahyuna., 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
- Dubey, Ashwini Kumar dan Kadivelu Jeevaratnam. 2018. Purification and Characterization of an Antibacterial Peptide (Bacteriocin) Produce by *Weissella confusa* AJ79. *IOSR JOURNLS of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. 13(2) Ver III:17-24.
- Elsair, Rohmasi. 2012. *Fundamentals of Chemistry*. Denmark: Ventus Publishing Aps
- Emmanuelle, Amanda. 2013. Integrated Process Production and Extraction of The Fibrinolytic Protease from *Bacillus sp.* UFPEDA 48. *Biochem Biotechnol* 170:1676-1688.
- Fatoni, Amin., Zufahair., Puji Lestari. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah tahu. *Jurnal Natur Indonesia* 10(2): 83-88
- Febriyansari, A.N. 2008. Penerapan model gompertz pada pertumbuhan bakteri *L. acidophilus* dan *B. longum* di media adonan es krim (ice cream mix atau ICM) jenis standar. *Skripsi*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Franz, C. M. A. P. 2015. The Genus *Weissella*: Taxonomy, Ecology And Biotechnological Potential. *Frontiers in Microbiology*. 6. 155.
- Fusco, V., Quero, G.M., Stea, G., Morea, M., Visconti, A., 2011. Novel PCR-Based Identification of *Weissella confusa* Using an AFLP-Derived Marker. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 437–443.

- Goh, Hweh Fen., Koshy Philip. 2015. Purification and Characterization of Bacteriocin Produce by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin. *PLoS ONE* 10(10):e0140434.
- Gupta, R., Beg, Q.K., dan Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:15-32
- Hames, D., dan Hooper, N. 2005. *Biochemistry*. Ed-4. New York: Taylor and Francis Group.
- Haq I dan Mukhtar H. 2006. Biosynthesis of Protease from *Lactobacillus Paracasei*: Kinetic Analysis of Fermentation Parameters. *Ind J Biochem Biophys.* 43 : 377-381.
- Hardiningsih, R., R.N.R. Napitupulu dan T. Yulinery. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas.* 7 (1) : 15-17.
- Hawab, H. M. 2004. *Pengantar Biokimia*. Malang: Bayumedia publishing.
- Hutkins, R. W. 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Iowa: IFT Press. Blackwell Publishing Ltd. hlm 3-49.
- Irena, Amelinda. 2010. Isolasi dan Optimasi Protease Bakteri Thermofilik dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biokimia FMIPA IPB.
- Kajala, Ikka., Qiao shi, Antti Nyssola., ndegwa Henry Maina., Yaxi Hou, Kati Katina., Maija Tenkanen., Riikka Juvonen. 2015. Cloning and Characterization of *Weissella confusa* Dextranurase and its Application in Hight Fibre Baking. *PLoS One* 10(1):e0116418.
- Kamboj, Kamal., Amber, Vasquez., Joan-Miquel Balada-Liasat. 201. Identification and Significance of *Weissella* Species Infection. *Frontiers in Microbiology*. Vol 6. Artikel 1204.
- Karniati, N. 2015. Produksi Enzim Protease dari Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam. *Thesis*. Bogor: Sekolah paka sarjana IPB
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides : From science to applications. *Journal of Functional Food* 1: 177–187.
- Kosim, M dan Putra, S.R. 2010. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. Surabaya: ITS.
- Lee, Kang Wook., Park, Ji Yeong., Jeong, Hee Rok., Heo, Ho Jin., Han, Nam Soo., Kim, Jeong Hwan. (2012). Probiotic Properties of *Wissella* Strains Isolated From Human Faeces. *Anaerobe.* 18 (1) 96-102.
- Lehninger, A.L. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.

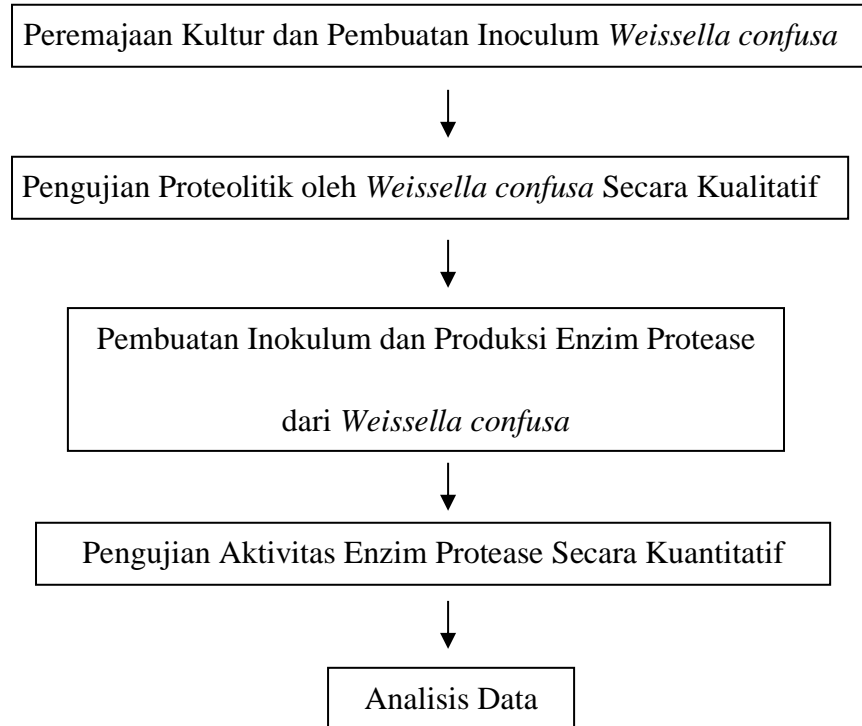
- Matthews, P, 2004. Genetic diversity in taro and the preservation of culinary knowledge. *Ethonobotany Journal* 2(1547), 55-77
- Mulja, M., LSuharman. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga.
- Mulja, M., Suharman. 2009. Analisis Instrumental. *Jurnal Kimia Analitik* 1:114-138.
- Mutia, Ulfa. 2013. “Uji Kadar Asam Laktat Pada Keju Kacang Tanah (*Arachis Hypogaea* L.) Berdasarkan Variasi Waktu dan Konsentrasi Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus lactis*”. *Jurnal Kimia Mulawarman* 10(2): 58-62.
- Nakanishi, T., Minamiura, N., Yamamoto, T. 1974. *Argicultural Biological Chemistry*. 38,37-44.
- Oke, M. A., A. A. Onilude. 2014. Parcial Purification and Characterization of Ekstracellular Protease from *Pedicoccus acidilactici*. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science* 22(1&2): 19-25.
- Olano, A., Chua, J., Schroeder, S., Minari, A., La Salvia, M., Hall, G., 2001. *Weissella confusa*(Basonym: *Lactobacillus confusus*) Bacteremia: A Case Report. *J. Clin. Microbiol* 39(4), 1604–1607.
- Pelczar, M. J., dan Chan E. C. S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., McSweeney, P.L.H. & Parente, E. 2008. Acids production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheese: A multivariate screening study. *Int. Dairy Journal*. 18: 81-92.
- Poedjiadi, A., Supriyanti, T. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia Edisi Revisi*. Jakarta: UI-Press.
- Poernomo, A. T., dan Purwanto, D.A., 2003. Uji Aktifitas Crude Enzim Proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah. *Majalah Farmasi Airlangga*, 3: 103–107.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Yogyakarta.
- Puspitasari, Fajar Diah. Shovitri, Maya. dan Kuswytasari. (2012). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangki Septik. *Jurnal Sains Dan Seni*. ITS. 1(1).
- Rajalingam D., C. Loftis, J. J. Xu, and T. K. S. Kumar. 2009. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Science*. 18: 980-993.

- Saidah, Afif Nur. 2014. Isolasi Bakteri Proteolitik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Protease. *Skripsi*. Malang: UIN Malang.
- Sharma, S., Kandasamy, S., Kavitate, D., Prathap, k, & Shetty, H. 2018. Probiotic characterization and antioxidant properties of *Weissella confusa* KR780676, isolated from an Indian fermented food. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 97, 53–60.
- Shukla, Shraddha., Arun Goyal. 2011. 16S rRNA-Based Identification of a Glican-Hyperproducing *Weissella confusa*. *Research Article*. 250842.
- Soeka, Yati Sudaryati., Sulistiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus Subtilis* AI Inacc B398 yang Diisolasi dari Terasi Samarinda. *Berita Biologi* 13(2): 203-212.
- Sturino, J. M. 2018. Literature-based safety assessment of an agriculture and animal-associated microorganism: *Weissella confusa*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 95(1), 142–152.
- Sugiyono, Lintang R A.J & Sabe RA. 2008. Karakterisasi Protease Bakteri Termofil Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. *Penelitian Perikanan*, 11: 2
- Suhartati, T. 2017. Dasar-dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organic. Lampung: *AURA*.
- Sulistyaningtyas, A. S., Praseryawan S., Sutrisno. 2013. Pengaruh Penambahan ion Fe^{3+} Terhadap Aktivitas Xilanase Dari *Trichoderma viride*. *Kimia Student journal* 2(2): 470-476.
- Sulthoniyah, Siti Thaniyatul Miratis., Handoko., Happy Nursyam. 2015. Characterization of Extracellular Protease Lactic Acid Bacteria From Shrimp Paste. *JLSB* 5(1): 01-05.
- Surono, I. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT Tri Cipta Karya, Jakarta.
- Sutandi C. 2003. Analisis Potensi Enzim Protease Lokal. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Sutrino, J. M. (2018). Literature-based safety assessment of an agriculture-and animal-associated microorganism: *Weissella confusa*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 142–152.
- Suwardana, W. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif. *Journal of Veterinery*. 8(4):155-159.

- Tenea, G. N., Hurtado, P., & Ortega, C. (2018). Inhibitory effect of substances produced by native *Lactococcus lactis* strains of tropical fruits towards food pathogens. *Preventive Nutrition on Food Science*, 23(3), 260–268.
- Toha, Abdul Hamid A. 2001. Biokimia: *Metabolisme Boimolekul*. Bandung: Alfabeta.
- Tulini, Fabricio L., Nolwenn Hymery., Thomas Haertle., Gwenaelle Le Blay., Elaine C P De Martinis. 2015. Screening for Antimicrobial and Proteolytic Actyivities of Lactic Acid Bacteria Isolated From Cow, Buffalo and Goad Milk and Cheeses Marketed in the Southeast Region Of Brazil. *Journal of Dairy Research* 83: 155-124
- Utari, Esti., Lina Nurita., Sattya Arimurti. 2009. Karakterisasi Peotease Ekstrak Kasar *Bacillus sp 31*. *Jurnal ILMU DASAR* 10 No.1.:102-108. Jurusan Biologi FMIPA Univ. Jember.
- Widhyastuti, N., Naiola E. 2002. Isolasi, seleksi, dan Optimasi produksi protease dari beberapa isolate bakteri. *Berita Biologi* 6:467-473.
- Wikandari, Prima Retno., Suparmo., Yustinus Marsono., Endang Sutriswati Rahayu. 2012. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik pada Bekasam. *Jural Natur Indonesia* 14(2): 120-125.
- Yati, S. S. dkk. 2011. Kemampuan *Bacillus Licheniformis* dalam Memproduksi Enzim Protease yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Media Litbang Kesehatan*. Vol. 21, No 2.
- Yuniati, Rani., Titania T. Nugroho., Fifi Puspita. 2015. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus Sp*. Galur Lokal Riau. *Jom FMIPA*. 11(2): 116-112.
- Yusmarini R, Indarti T, Utami Y, Marsono. 2010. Aktivitas Proteolitik Bakteri Asam Laktat dalam Fermentasi Susu Kedelai. *J Teknol Indus Pangan*. 21 : 2.
- Yustriah Dan Kuswytasari, Nengah Dwianita. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium Sp*. *Jurnal Sains dan Seni POMITS*. Vol 2. No 1.

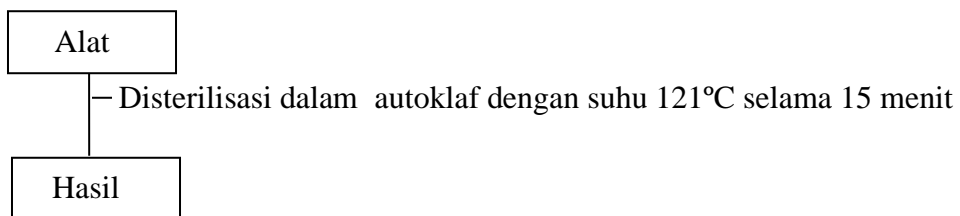
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



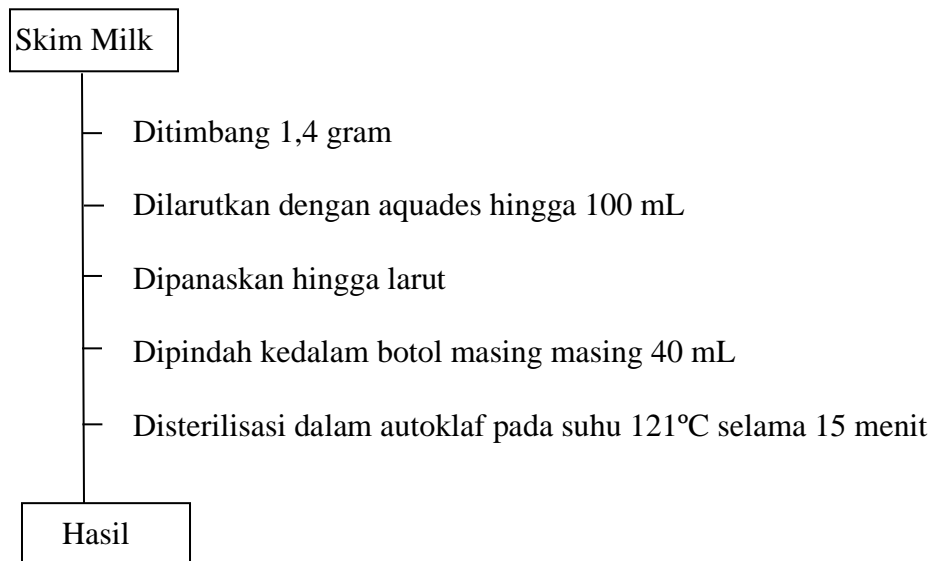
Lampiran. 2 Skema Kerja

2.1 Preparasi Alat Dan Bahan

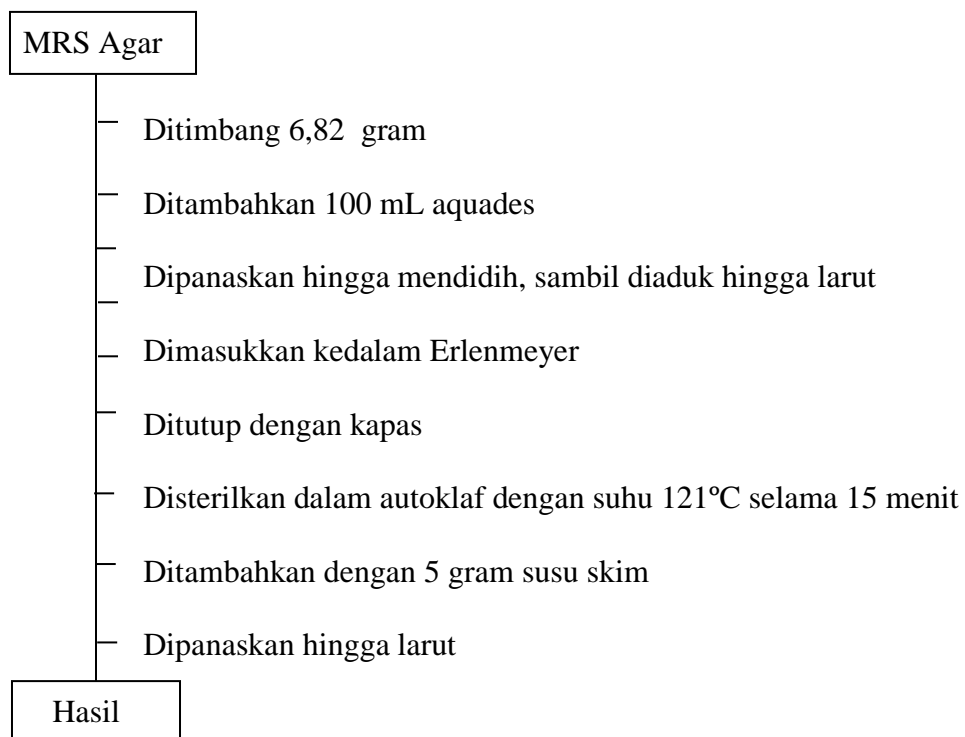


2.2 Pembuatan Media

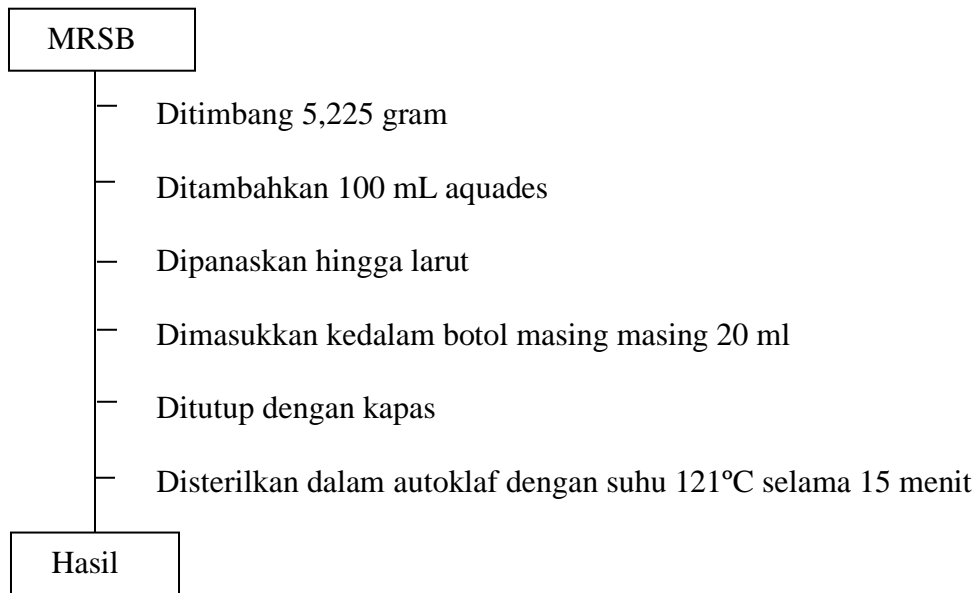
2.2.1 *Skim Milk Broth (SMB)*



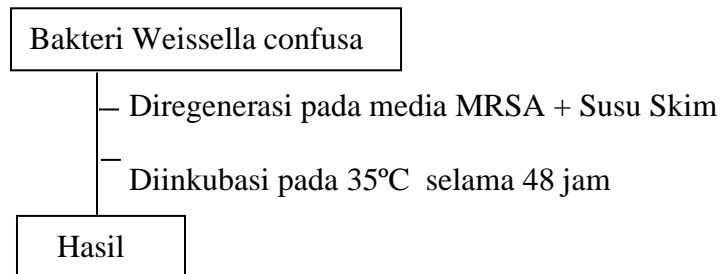
2.2.2 Media MRSA-Susu Skim



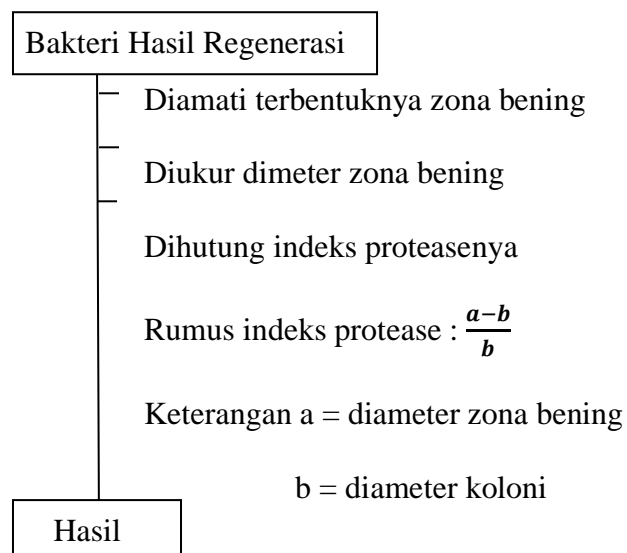
2.2.3 Media MRSB



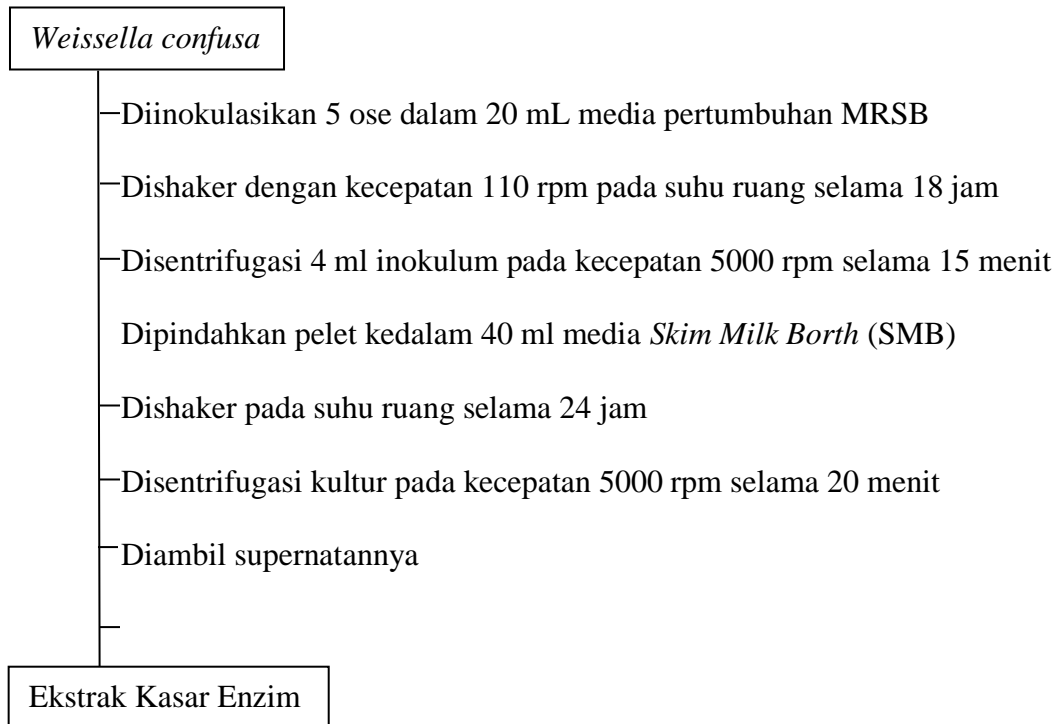
2.3 Regenerasi Bakteri *Weissella confusa*



2.4 Uji Proteolitik oleh *Weissella confusa* Secara Kualitatif

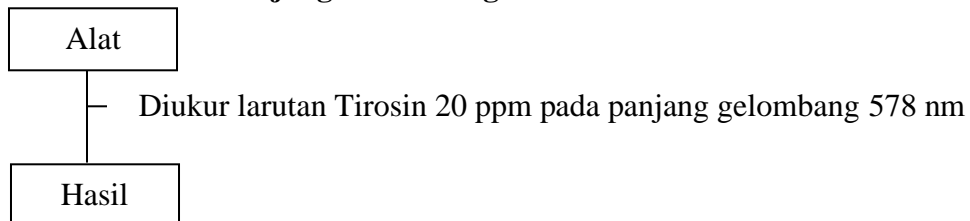


2.5 Pembuatan Inokulum dan Produksi Enzim Protease dari *Weissella confusa*

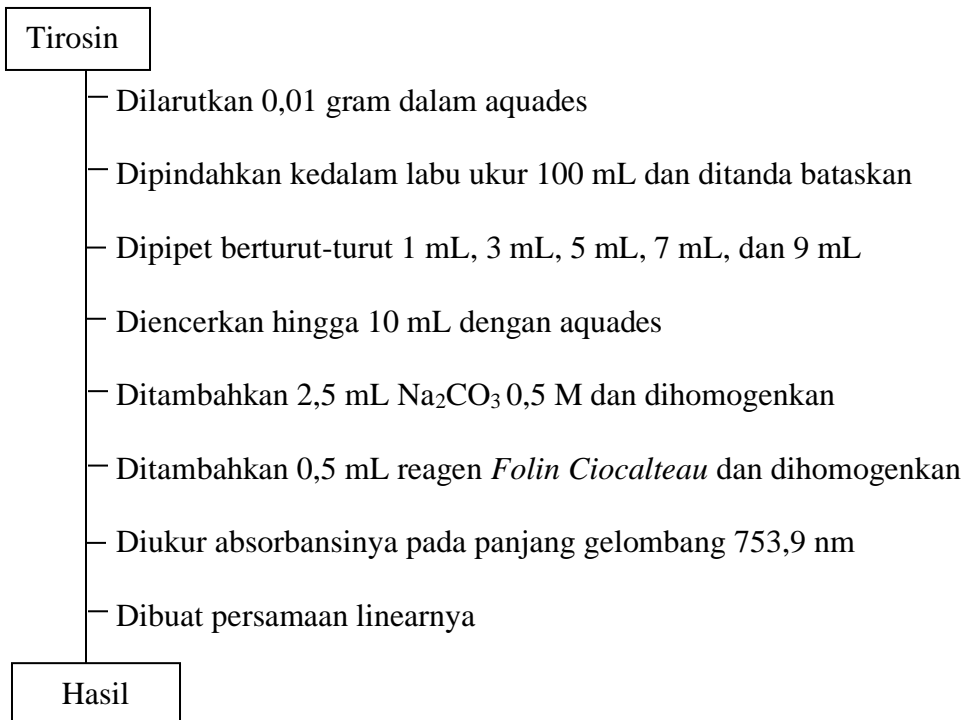


2.6 Uji Aktivitas Protease Kasar

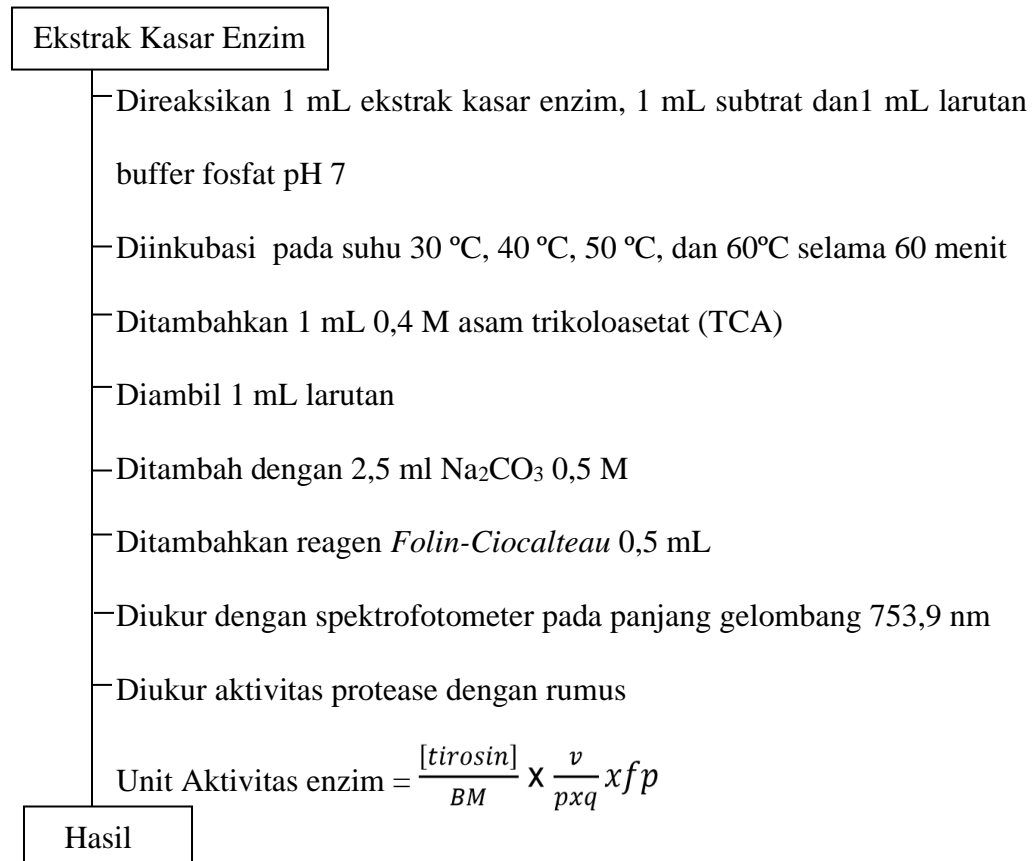
2.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



2.6.2 Pembuatan Kurva Standart Tirosin



2.6.3 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease



2.6.4 Pengaruh Volume Enzim Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Ekstrak Kasar Enzim

- Direaksikan 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL ekstrak kasar enzim, 1 mL subtrat dan 1 mL larutan buffer fosfat pH 7
- Diinkubasi pada suhu 40°C selama 60 menit
- Ditambahkan 1 mL 0,4 M asam trikoloasetat (TCA)
- Diambil 1 mL larutan
- Ditambah dengan 2,5 ml Na₂CO₃ 0,5 M
- Ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteau* 0,5 mL
- Diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 753,9 nm
- Diukur aktivitas protease dengan rumus

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

Hasil

Lampiran 3. Pembutan Media dan Reagen

3.1 Pembuatan Media Skim Milk Broth Dalam 1000 mL

- a. Dilarutkan 20 gram susu skim dalam 250 aquades .
- b. Dipasteurisasi pada suhu 80 °C dan pertahankan selama 30 menit.
- c. Dilarutkan 5 gram peton; 2,5 gram yeast ekstrak, dan 1,0 gram *dextrose* dalam 750 mL aquades.
- d. Diseterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.
- e. Susu skim yang di pasteurisasi dicampur dengan bahan-bahan yang telah disterilisasi dalam keadaan steril.

3.2 Pembuatan Media *De Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSa) dalam 1000 mL

- Dilarutkan 68,2 gram MRS agar dalam 1000 mL
- Dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga larut.
- Dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan ditutup dengan kapas
- Diseterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.3 Pembuatan Media *De Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) dalam 1000 mL

- Dilarutkan 55, 15 gram MRS dalam 1000 mL
- Dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk hingga larut.
- Dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan ditutup dengan kapas.
- Diseterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4 Pembuatan Larutan TCA

Larutan TCA 0,4 M dibuat dengan melarutkan 6,55gr TCA dalam 100 mL aquades.

$$M = \frac{n}{V}$$

$$0,4 \text{ M} = \frac{n}{0,1 \text{ L}}$$

$$n = 0,04 \text{ mol}$$

$$n = \frac{\text{massa}}{Mr}$$

$$0,04 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{163,67 \text{ g/mol}}$$

$$\text{Massa} = 0,04 \text{ mol} \times 163,67 \text{ g/mol}$$

$$= 6,55 \text{ gr}$$

3.5 Pembuatan larutan Na₂CO₃

Larutan Na₂CO₃ 0,5 M dibuat dengan melarutkan 5,3 gr Na₂CO₃ dalam 100 mL aquades.

$$M = \frac{n}{V}$$

$$0,5 \text{ M} = \frac{n}{0,1 \text{ L}}$$

$$n = 0,05 \text{ mol}$$

$$n = \frac{\text{massa}}{M_r}$$

$$0,05 \text{ mol} = \frac{\text{massa}}{106 \text{ g/mol}}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa} &= 0,05 \text{ mol} \times 106 \text{ g/mol} \\ &= 5,3 \text{ g} \end{aligned}$$

3.6 Pembuatan 0,5 M Buffer Fosfat pH 7

Larutan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dibuat dengan mencampurkan 3,179 gram Na₂HPO₄ dan NaH₂PO₄ sebanyak 3,810 gram dan dilarutkan dalam aquades sampai 1000 mL.

Perhitungan:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left[\frac{\text{Na}_2\text{HPO}_4}{\text{NaH}_2\text{PO}_4} \right]$$

$$7 = 7,21 + \log \left[\frac{\text{Na}_2\text{HPO}_4}{\text{NaH}_2\text{PO}_4} \right]$$

$$\log \left[\frac{\text{Na}_2\text{HPO}_4}{\text{NaH}_2\text{PO}_4} \right] = -0,21$$

$$\left[\frac{\text{Na}_2\text{HPO}_4}{\text{NaH}_2\text{PO}_4} \right] = \frac{0,6}{1,0}$$

$$\% \text{Na}_2\text{HPO}_4 = \frac{0,6}{0,6+1,0} \times 100\%$$

$$= \frac{0,6}{1,6} \times 100\%$$

$$= 37,5 \%$$

$$\% \text{NaH}_2\text{PO}_4 = \frac{1,0}{0,6+1,0} \times 100\%$$

$$= \frac{1,0}{1,6} \times 100\%$$

$$= 62,5\%$$

$$\text{gr Na}_2\text{HPO}_4 = \% \times \text{M} \times \text{BM}$$

$$= 0,375 \times 0,05 \times 142$$

$$= 2,663 \text{ gr}$$

$$\text{gr NaH}_2\text{PO}_4 = \% \times \text{M} \times \text{BM}$$

$$= 0,625 \times 0,05 \times 138$$

$$= 4,312 \text{ gr}$$

Lampiran 4. Perhitungan

4.1 Uji Proteolitik oleh *Weissella confusa* Secara Kualitatif

Data hasil uji proteolitik oleh *Weissella confusa* secara kualitatif dapat dilihat dari nilai indeks protease pada Tabel L.1:

Tabel L.1 Indeks protease dari Masing-Masing Isolat

Jenis Bakteri	Diameter Zona Bening	Diameter Bakteri	Indeks protease
B	6,0	0,6	9,0

Rumus indeks protease : $\frac{a-b}{b}$ L.1

Keterangan : a = diameter zona bening

b = diameter koloni

- Isolat B: $\frac{6 - 0,6}{0,6}$

$$: \frac{5,4}{0,6}$$

$$: 9,0$$

4.2 Uji Aktivitas Protease Kasar

4.2.1 Kurva Standart Tirosin

Konsentrasi Larutan stok tirosin

BM $C_9H_{11}NO_3$ adalah 181 g/mol

$$[\text{Tirosin}] = \frac{m}{V}$$

$$= \frac{0,01 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

$$= \frac{10 \text{ mg}}{0,1 \text{ mL}}$$

$$= 100 \text{ mg/L}$$

- Konsentrasi larutan standar tirosin dengan volume 1 mL

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

$$1 \text{ mL} \times 100 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$M_2 = 10 \text{ mg/L}$$

- Konsentrasi larutan standar tirosin dengan volume 3 mL

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

$$3 \text{ mL} \times 100 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$M_2 = 30 \text{ mg/L}$$

- Konsentrasi larutan standar tirosin dengan volume 5 mL

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

$$5 \text{ mL} \times 100 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$M_2 = 50 \text{ mg/L}$$

- Konsentrasi larutan standar tirosin dengan volume 7 mL

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

$$7 \text{ mL} \times 100 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

$$M_2 = 70 \text{ mg/L}$$

- Konsentrasi larutan standar tirosin dengan volume 9 mL

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

$$9 \text{ mL} \times 100 \text{ mg/L} = 10 \text{ mL} \times M_2$$

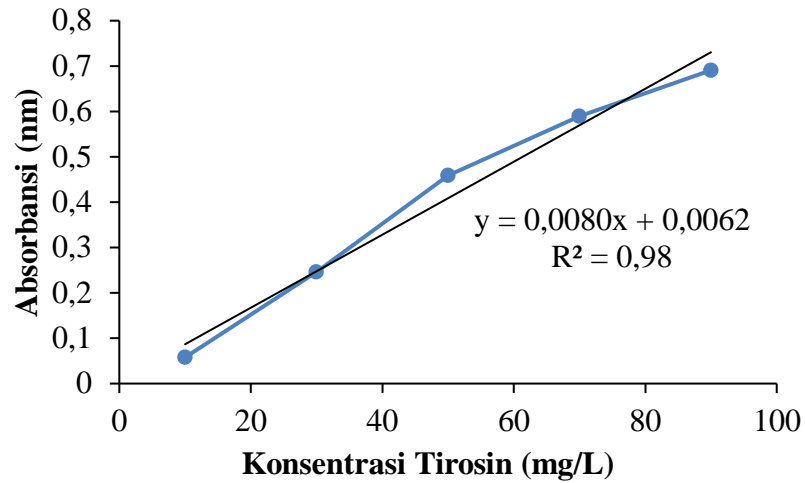
$$M_2 = 90 \text{ mg/L}$$

Data hasil pembuatan kurva standar tirosin dapat dilihat pada Tabel L.2:

Tabel L.2 Kurva Standart Tirosin

Volume Tirosin (mL)	Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi (nm)
1	10	0,0577
3	30	0,2464
5	50	0,4582
7	70	0,5897
9	90	0,6907

Hubungan antara konsentrasi tirosin dan absorbansi yang ditunjukkan pada Gambar L.1 menghasilkan nilai $Y = 0,0080 X + 0,0062$ dan $R^2 = 0,9799$.



Gambar L.1 Kurva Standar Tirosin

4.2.2 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Protease

Aktivitas Enzim (AE) dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Unit Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{BM}} \times \frac{V}{p \times q} \dots\dots\dots \text{L.2}$$

Keterangan : v = volume total substrat-enzim (ml)

p = jumlah enzim (ml)

q = waktu inkubasi (menit)

Konsentrasi tirosin data dihitung dari persamaan yang didapat pada kurva standar, yaitu: $Y = 0,0080x + 0,0062$. Data hasil uji aktivitas protease pada berbagai suhu dapat dilihat pada Tabel L.3:

Tabel L.3 Aktivitas Protease pada Berbagai Suhu

Suhu (°C)	Nama	Absorbansi (nm)	Konsentrasi (mg/L)	AE (U/mLx 10 ⁻⁰³)
30	Kontrol	0,1884	22,7750	4,1943
	Ulangan 1	0,4114	50,6500	9,3278
	Ulangan 2	0,3210	39,3500	7,2468
	Ulangan 3	0,3652	44,8750	8,2643
40	Kontrol	0,2069	25,0875	4,6202
	Ulangan 1	0,4150	51,1000	9,4107
	Ulangan 2	0,4673	57,6375	10,0615
	Ulangan 3	0,4046	49,8000	9,1713
50	Kontrol	0,2135	25,9125	4,7721
	Ulangan 1	0,4074	50,1500	9,2357
	Ulangan 2	0,4244	52,2750	9,6271
	Ulangan 3	0,4111	50,6125	9,3209
60	Kontrol	0,1962	23,7500	4,3738
	Ulangan 1	0,3845	47,2875	8,7086
	Ulangan 2	0,4168	51,3250	9,4521
	Ulangan 3	0,3925	48,2875	8,8927

- Suhu 30°C

- Kontrol

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,1884 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,1884 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 22,775$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{22,775}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 4,1943 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 1

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4114 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4114 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 50,6500$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{50,6500}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 9,3278 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 2

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,3210 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,3210 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 39,3500$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{39,3500}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 7,2468 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 3

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,3652 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,3652 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 44,8750$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{44,8750}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 8,2643 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Suhu 40°C

- Kontrol

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,2069 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,2069 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 25,0875$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{25,0875}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 4,6202 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 1

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4150 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4150 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 51,1000$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{51,1000}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 9,4107 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 2

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4673 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4673 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 57,6375$$

$$AE = \frac{57,6375}{181} \times \frac{2}{1 \times 60}$$

$$= 10,6156 \times 10^{-03}$$

- Ulangan 3

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4046 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4046 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 49,8000$$

$$AE = \frac{49,8000}{181} \times \frac{2}{1 \times 60}$$

$$= 9,1713 \times 10^{-03}$$

- Suhu 50°C

- Kontrol

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,2135 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,2135 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 25,9125$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{25,9125}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 4,7721 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 1

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4074 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4074 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 50,1500$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{50,1500}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 9,2357 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 2

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4244 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4244 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 52,2750$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{52,2750}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 9,6271 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 3

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4111 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4111 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 50,6125$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{50,6125}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 9,3209 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

- Suhu 60°C

- Kontrol

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,1962 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,1962 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 23,7500$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{23,7500}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 4,3738 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

- Ulangan 1

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,3845 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,3845 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 47,2875$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{47,2875}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 8,7086 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

- Ulangan 2

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4168 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4168 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 51,3250$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{51,3250}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 9,4521 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

- Ulangan 3

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,3925 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,3925 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 48,2875$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{48,2875}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 8,8927 \times 10^{-03} \end{aligned}$$

4.2.3 Pengaruh Volume Enzim Terhadap Aktivitas Protease

Data hasil Uji aktivitas protease pada berbagai volume enzim dapat dilihat pada Tabel L.4:

Tabel L.4 Aktivitas Protease pada Berbagai Volume Enzim

Ulangan	Volume Enzim	Absorbansi (nm)	Konsentrasi (mg/L)	AE (U/mLx 10 ⁻⁰²)
1	0,5 mL	0,5326	65,8000	1,8177
	1,0 mL	0,5960	73,7250	1,3577
	1,5 mL	0,6230	77,1000	1,1832
	2,0 mL	0,6806	84,3000	1,1644
2	0,5 mL	0,4244	52,2750	1,4441
	1,0 mL	0,5260	64,9750	1,1966
	1,5 mL	0,6413	79,3875	1,2183
	2,0 mL	0,6840	84,7250	1,1702
3	0,5 mL	0,4455	54,9125	1,5169
	1,0 mL	0,5171	63,8625	1,7642
	1,5 mL	0,5953	73,6375	1,1301
	2,0 mL	0,6179	76,4625	1,0561
4	0,5 mL	0,4666	57,5500	1,5898
	1,0 mL	0,5877	72,6875	1,3386
	1,5 mL	0,6170	76,3500	1,1717
	2,0 mL	0,6886	85,3000	1,1782

- Ulangan 1

- 0,5 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,5326 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,5326 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 65,8000$$

$$AE = \frac{65,8000}{181} \times \frac{1,5}{0,5 \times 60}$$

$$= 1,8177 \times 10^{-02}$$

- 1,0 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,5960 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,5960 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 73,7250$$

$$AE = \frac{73,7250}{181} \times \frac{2}{1 \times 60}$$

$$= 1,358 \times 10^{-02}$$

- 1,5 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,6230 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,6230 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 77,1000$$

$$AE = \frac{77,1000}{181} \times \frac{2,5}{1,5 \times 60}$$

$$= 1,1832 \times 10^{-02}$$

- 2,0 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,6806 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,6806 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 84,3000$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{84,3000}{181} \times \frac{3}{2 \times 60} \\ &= 1,1644 \times 10^{-02} \end{aligned}$$

- Ulangan 2

- 0,5 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4244 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4244 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 52,2750$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{52,2750}{181} \times \frac{1,5}{0,5 \times 60} \\ &= 1,4441 \times 10^{-02} \end{aligned}$$

- 1,0 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,5260 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,5260 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 64,9750$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{64,9750}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 1,1966 \times 10^{-02} \end{aligned}$$

- 1,5 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,6413 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,6413 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 79,3875$$

$$AE = \frac{79,3875}{181} \times \frac{2,5}{1,5 \times 60}$$

$$= 1,2183 \times 10^{-02}$$

- 2,0 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,6840 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,6840 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 84,7250$$

$$AE = \frac{84,7250}{181} \times \frac{3}{2 \times 60}$$

$$= 1,1702 \times 10^{-02}$$

- Ulangan 3

- 0,5 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,4455 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,4455 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 54,9125$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{54,913}{181} \times \frac{1,5}{0,5 \times 60} \\ &= 1,517 \times 10^{-02} \end{aligned}$$

- 1,0 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,5171 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,5171 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 63,8625$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{63,8625}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\ &= 1,7642 \times 10^{-02} \end{aligned}$$

- 1,5 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,5953 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,5953 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 73,6375$$

$$\begin{aligned} \text{AE} &= \frac{73,6375}{181} \times \frac{2,5}{1,5 \times 60} \\ &= 1,1301 \times 10^{-02} \end{aligned}$$

- 2,0 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,6179 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,6179 - 0,0062}{0,0080}$$

$$\begin{aligned}
 x &= 76,4625 \\
 \text{AE} &= \frac{76,4625}{181} \times \frac{3}{2 \times 60} \\
 &= 1,0561 \times 10^{-02}
 \end{aligned}$$

- Ulangan 4

- 0,5 mL

$$\begin{aligned}
 Y &= 0,0080 x + 0,0062 \\
 0,4666 &= 0,0080 x + 0,0062 \\
 x &= \frac{0,4666 - 0,0062}{0,0080} \\
 x &= 57,5500 \\
 \text{AE} &= \frac{57,5500}{181} \times \frac{1,5}{0,5 \times 60} \\
 &= 1,5898 \times 10^{-02}
 \end{aligned}$$

- 1,0 mL

$$\begin{aligned}
 Y &= 0,0080 x + 0,0062 \\
 0,5877 &= 0,0080 x + 0,0062 \\
 x &= \frac{0,5877 - 0,0062}{0,0080} \\
 x &= 72,6875 \\
 \text{AE} &= \frac{72,6875}{181} \times \frac{2}{1 \times 60} \\
 &= 1,3386 \times 10^{-02}
 \end{aligned}$$

- 1,5 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,6170 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,6170 - 0,0062}{0,0080}$$

$$x = 76,3500$$

$$AE = \frac{76,3500}{181} \times \frac{2,5}{1,5 \times 60}$$

$$= 1,1717 \times 10^{-02}$$

- 2,0 mL

$$Y = 0,0080 x + 0,0062$$

$$0,6886 = 0,0080 x + 0,0062$$

$$x = \frac{0,6886 - 0,0062}{0,0080}$$

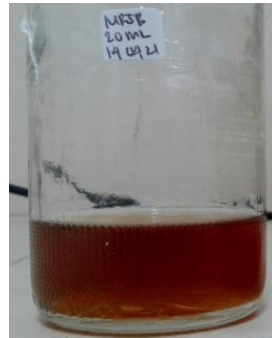
$$x = 85,3000$$

$$AE = \frac{85,3000}{181} \times \frac{3}{2 \times 60}$$

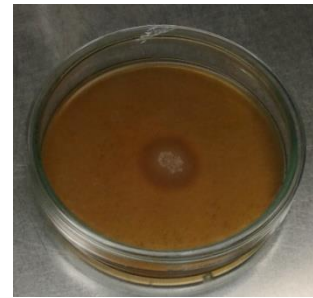
$$= 1,1782 \times 10^{-02}$$

Lampiran 5. Dokumentasi

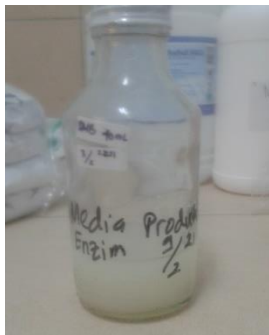
Gambar L.2 Regenerasi
Bakteri



Gambar L.3 Inokulum
Weissella confusa



Gambar L.4 Uji
kualitatif enzim protease



Gambar L.5 Enzim
Protease



Gambar L.6 Uji Aktivitas Enzim Protease