

**PENGARUH pH DAN KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

Oleh:

SITI LAILIN NUR JANNAH

NIM. 16630090



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

2022

**PENGARUH pH DAN KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

**Oleh :
SITI LAILIN NUR JANNAH
NIM. 16630090**

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

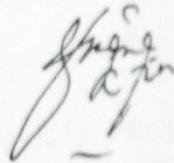
**PENGARUH pH DAN KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

oleh
SITI LAILIN NUR JANNAH
NIM. 16630090

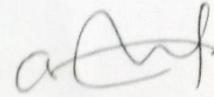
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal, 29 November 2022

Pembimbing I



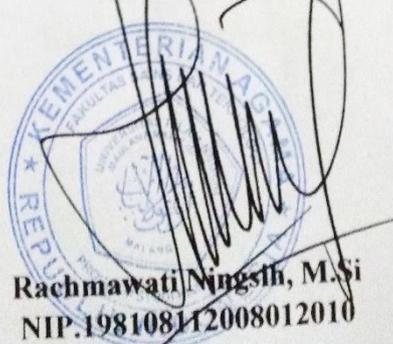
Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P
NIP.19760105201802012248

Pembimbing II



Oky Bagas Prasetyo, M.Pd
NIDT.198901132011802011244

Mengetahui
Ketua Program Studi



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP.198108112008012010

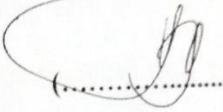
**PENGARUH pH DAN KONSENTRASI SUBSTRAT TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Weissella confusa***

SKRIPSI

Oleh:
SITI LAILIN NUR JANNAH
NIM. 16630090

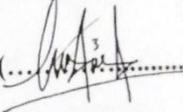
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi Dan
Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal:

Penguji Utama : Himmatul Barroroh, M.Si
NIP. 19750730 200312 2 001



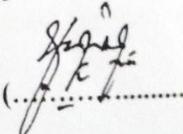
(.....)

Anggota Penguji I : Fadilah Nor Laili Lutfia, M.Biotech
LB. 63033



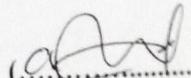
(.....)

Anggota Penguji II : Dr. Anik Maunatin, S.T.,M.P
NIP. 19760105 20180201 2 248



(.....)

Anggota Penguji III : Oky Bagas Prasetyo
NIDT.19890113201 180201 1 244



(.....)

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Rachmatwaningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 1 010



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Siti Lailin Nur Jannah

NIM : 16630090

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat terhadap Protease
yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa*

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

Malang, 27 Desember 2022

Yang membuat pernyataan



Siti Lailin Nur Jannah
NIM. 16630090

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

Orang tua saya tercinta yang senantiasa memberikan kasih sayang, didikan serta do'a yang selalu mengiringi setiap langkah saya. Serta kepada kakak saya sebagai pengingat dan penyemangat.

MOTTO

“ Dalam setiap kesulitan pasti ada kemudahan, selalu berusaha diikuti dengan do'a “

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkah dan rahmat yang telah dilimpahkan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan hasil penelitian berjudul **“Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Protease yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa*”**. Adapun tujuan dari penulisan skripsi penelitian ini adalah syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains di Universitas Islam Negeri Malang.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang memberikan dukungan moril maupun materil sehingga proposal ini dapat diselesaikan, terutama kepada :

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Sudar dan Ibu Siti Muyasarotin yang selalu memberikan do'a serta kasih sayang, semangat dan juga motivasi untuk bisa menyelesaikan kuliah dengan lancar.
2. Rachmawati Ningsih, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
3. Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu memberi pengarahan serta pengalaman.
4. Oky Bagas Prasetyo selaku dosen pembimbing agama atas saran, masukan dan bimbingan yang telah diberikan selama penulisan skripsi.
5. Himmatul Barroroh, M.Si dan Fadilah Nor Laili Lutfia, M.Biotech selaku penguji yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan dan memberikan masukan dalam penyusunan skripsi ini.
6. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, dan pengalaman.
7. Teman-teman angkatan 2016 yang selalu mendukung dan menyemangati dalam pengerjaan proposal ini hingga bisa terselesaikan dengan baik.
8. Sahabatku Novia Anggraeni, terimakasih atas dorongan semangat dan motivasi untuk penulis.

Akhir kata penulis mengakui skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi menyempurnakan skripsi ini. Semoga tulisan ini dapat

memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan. Demikian dari penulisan penelitian ini semoga dapat memberi manfaat untuk semua pihak.

Malang, 27 Desember 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
مستخلص البحث	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)	6
2.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	7
2.3 Bakteri <i>Weissella confusa</i>	9
2.4 Enzim Protease.....	11
2.5 Tirosin	13
2.6 Uji Aktivitas Enzim Protesase.....	13
2.7 Faktor yang mempengaruhi Aktivitas Enzim	16
2.8 Spektrofotometer	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	21
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.2.1 Alat Penelitian	21
3.2.2 Bahan.....	22
3.3 Rancangan Penelitian	23
3.4 Tahap Penelitian	24
3.5 Prosedur Penelitian	24
3.5.1 Pembuatan Media	24

3.5.1.1 <i>Media De Man Ragosa Sharpe Agar (MRSA)</i>	24
3.5.1.2 <i>Media De Man Ragosa Sharpe Broth (MRSB)</i>	24
3.5.1.3 <i>Media Skim Milk Broth (SMB)</i>	24
3.5.2 Pembuatan Buffer.....	25
3.5.3 Pembuatan Substrat	25
3.5.4 Produksi dan Ekstraksi Enzim Protease	26
3.5.4.1 Peremajaan Bakteri	26
3.5.4.2 Pembuatan Inokulum Bakteri	26
3.5.4.3 Produksi Enzim Protease	26
3.5.5 Kurva Standar Tirosin	27
3.5.5.1 Penentuan panjang gelombang maksimum.....	27
3.5.5.2 Pembuatan Kurva Standart Tirosin.....	27
3.5.6 Uji Aktivitas Enzim Protease	28
3.5.6.1 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease.....	28
3.5.6.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Protease	29
3.6 Analisa Data	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Pembuatan Media	30
4.2 Regenerasi <i>Weissella confusa</i>	31
4.3 Pembuatan Inokulum Bakteri.....	32
4.5 Kurva Standar Tirosin.....	35
4.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maximum.....	35
4.5.2 Penentuan Kurva Standar Tirosin	36
4.6 Uji Aktivitas Enzim Protease	38
4.6.1 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease	38
4.6.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Protease	42
BAB V PENUTUP	47
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA.....	48
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bakteri <i>Weissella confusa</i>	9
Gambar 2.2 Mekanisme umum hidrolisis enzimatis substrat peptida	12
Gambar 4. 1 Media MRSA (a), dan MRSB (b).....	30
Gambar 4. 2 Regenerasi bakteri, dimana (a) <i>W. confusa</i> dan (b) media MRSA...	32
Gambar 4. 3 Inokulum bakteri <i>Weissella confusa</i> pada media MRSB	33
Gambar 4. 4 Reaksi hidrolisis kasein (ikatan peptida menjadi asam amino).....	35
Gambar 4. 5 Reaksi antara <i>Folin ciocalteu</i> dengan tirosin	36
Gambar 4. 6 Kurva standar tirosin	37
Gambar 4. 7 Reaksi antara reagen <i>folin ciocalteu</i> dengan asam amino	39
Gambar 4. 8 Rata-rata aktivitas enzim protease pada berbagai pH	41
Gambar 4. 9 Rata-rata aktivitas enzim protease berbagai konsentrasi substrat	43

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Spektrum cahaya tampak dan warna komplementer	20
Tabel 3.1 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease.....	23
Tabel 3.2 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease	23
Tabel 4.1 Absorbansi larutan standar tirosin	37
Tabel 4.2 Pengaruh aktivitas enzim protease terhadap pH.....	40
Tabel 4.3 Aktivitas enzim protease terhadap konsentrasi substrat	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.Rancangan penelitian.....	55
Lampiran 2.Lampiran Kerja	56
Lampiran 3.Perhitungan	63
Lampiran 4.Hasil	68
Lampiran 5.Analisis data.....	72
Lampiran 6.Dokumentasi	75

ABSTRAK

Jannah, S. L. 2022. **Pengaruh pH dan Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Protease yang Dihasilkan oleh *Weissella confusa***. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang Pembimbing I: Dr. Anik Maunatin, S.T; Pembimbing II: M.P. Oky Bagus Prasetyo, M. Si

Kata Kunci: Konsentrasi Substrat, pH, Protease, *Weissella confusa*,

Perkembangan ilmu pengetahuan menjadikan manusia memanfaatkan enzim untuk kepentingan individu dan kelompok. Salah satunya enzim protease. Enzim protease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi asam amino dengan memutuskan ikatan peptida. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* dan mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan faktor tunggal. Faktor yang pertama adalah variasi pH 5, 6, 7 dan 8. Sedangkan faktor kedua variasi konsentrasi substrat 0,5%, 1%, 2,5% dan 3,5%. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA) dan terjadi perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji tukey taraf 5%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease tertinggi dari *Weissella confusa* pada pH 8 sebesar $7,692 \times 10^{-2}$ U/mL. Aktivitas enzim protease tertinggi pada pH digunakan untuk uji aktivitas enzim protease terhadap konsentrasi substrat. Aktivitas enzim protease tertinggi diperoleh pada konsentrasi substrat adalah 1% sebesar $6,701 \times 10^{-2}$ U/mL.

ABSTRACT

Jannah, S. L. 2022. Effect of pH and Substrate Concentration on Protease Activity Produced by *Weissella confusa* Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim Statue Islamic University, Malang. Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P: Adviser II: Oky Bagas Prasetyo, M. Si
Key: Substrate concentration, pH, Protease, *Weissella confusa*

The development of science makes humans use enzymes for the benefit of individuals and groups. One of them is the protease enzyme. Protease enzymes are enzymes that can hydrolyze proteins into amino acids by breaking peptide bonds. The purpose of this research was to determine the effect of pH on the activity of the protease enzyme produced by *Weissella confusa* and to determine the effect of substrate concentration on the activity of the protease enzyme produced by *Weissella confusa*.

This study used a completely randomized design (CRD) with a single factor. The first factor is the variation of pH 5, 6, 7 and 8. While the second factor is the variation of substrate concentration 0.5%, 1%, 2.5% and 3.5%. The data obtained were analyzed using Analysis Of Variance (ANOVA) and there was a significant difference followed by a 5% level Tukey test.

The results of this study indicate that the effect of pH on the activity of the highest protease enzyme from *Weissella confusa* at pH 8 is 7.692×10^{-2} U/mL. The highest activity of the protease enzyme at pH was used to test the activity of the protease enzyme against the concentration of the substrate. The highest activity of the protease enzyme was obtained at a substrate concentration of 1% at 6.701×10^{-2} U/mL.

مستخلص البحث

جنت، س. ل. ٢٠٢٢. تأثير الأس الهيدروجيني وتركيز الركيزة على نشاط البروتياز الناتج عن ويسيلا جونفوسا (*Weissella confusa*). البحث الجامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا بجامعة مولانا مالك إبراهيم الحكومية مالانج. المشرف الأول: د. عنيق معونة. المشرف الثاني: أوكي باغاس براستييو، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: تركيز الركيزة، درجة الحموضة، البروتياز، ويسيلا جونفوسا.

تطور العلم يجعل البشر يستخدمون الإنزيمات لصالح الأفراد والجماعات. من إحدى إنزيمات هي إنزيم البروتياز. إنزيم البروتياز هو إنزيم يمتلك القدرة على تحلل البروتينات إلى أحماض أمينية عن طريق كسر الروابط الببتيدية. الهدف من هذا البحث هو تحديد تأثير الأس الهيدروجيني على نشاط إنزيم البروتياز الناتج عن ويسيلا جونفوسا وتحديد تأثير تركيز الركيزة على نشاط إنزيم البروتياز الناتج عن ويسيلا جونفوسا.

استخدم هذا البحث تصميمًا عشوائيًا كاملاً (RAL) مع تكرار عامل واحد ثلاث مرات. العامل الأول هو الاختلاف في درجة الحموضة ٥ و ٦ و ٧ و ٨. ثم في ظروف الأس الهيدروجيني المتلى يشار إليها بأعلى نشاط إنزيم وتستخدم للعامل الثاني. في حين أن العامل الثاني هو الاختلاف في تركيز الركيزة بنسبة ٠,٥% و ١% و ٢,٥% و ٣,٥% (ANOVA) وكان هناك فرق كبير ويتبعه اختبار *tukey* بنسبة ٥%.

أعلى نشاط لإنزيم البروتياز الناتج عن ويسيلا جونفوسا عند الرقم الهيدروجيني ٨ مع نشاط إنزيم البروتياز $10^{-2} \times 692,7$ وحدة / مل. تم استخدام أعلى نشاط لإنزيم البروتياز عند الأس الهيدروجيني لاختبار نشاط إنزيم البروتياز مقابل تركيز الركيزة. كان أعلى نشاط لإنزيم البروتياز تم الحصول عليه عند تركيز الركيزة ١% من $10^{-2} \times 701,6$ وحدة / مل. تم تحليل البيانات المحسولة باستخدام تحليل التباين

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan ilmu pengetahuan yang pesat memungkinkan manusia memanfaatkan berbagai enzim untuk kepentingan manusia, salah satunya enzim protease (Baltaci, 2017). Protease digunakan dalam bidang industri sekitar 60% dan penjualan sekitar 40% di seluruh dunia. Enzim protease termasuk enzim kompleks yang dapat diterapkan dalam bidang industri seperti deterjen, makanan dan kulit. Enzim protease dapat mempercepat pemecahan ikatan peptida pada polipeptida dan protein menggunakan reaksi hidrolisis sehingga menjadi ikatan yang lebih sederhana. Enzim protease digunakan untuk mendegradasi protein dalam berbagai proses industri (Baehaki, 2019).

Protease ditemukan di berbagai sumber seperti tanaman, hewan dan bakteri. Bakteri merupakan sumber sangat baik untuk menghasilkan enzim protease karena dapat diproduksi dalam jumlah besar dan waktu singkat. Selain itu, dapat dimanipulasi secara genetik untuk menghasilkan enzim baru yang dapat diubah-ubah sesuai keinginan dalam berbagai aplikasinya. Mikroorganisme dapat menghasilkan protease yang digunakan dalam memecah polipeptida menjadi peptida dan asam amino (Ahmad, dkk, 2018). Bakteri yang dapat menghasilkan enzim protease seperti *Weissella confusa*.

Weissella confusa disebut juga *Lactobacillus confusus* yang diperoleh dari beberapa sumber makanan (Goh dan Koshy, 2015). Sumber untuk memperoleh *Weissella confusa* pada produk makanan antara lain susu, jus buah (Di Cagno, dkk,

2013), sayuran (Sade, dkk, 2016) dan daging fermentasi (Tanasupawat, dkk, 2015). *Weissella confusa* merupakan bakteri gram positif, tidak membentuk spora, bersifat heterofermentatif, memiliki bentuk batang tidak beraturan atau kokid (Shukla, 2011). Menurut penelitian Quttrini, dkk (2019) *Weissella confusa* menunjukkan kemampuan adaptasi terhadap suhu 45°C, dan pH sebesar 6-9.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yaitu pH dan konsentrasi substrat. Untuk mengetahui karakter dari enzim protease dalam menghidrolisis protein menjadi asam aminonya agar mencapai aktivitas maksimumnya sehingga penelitian ini menggunakan pengaruh pH dan konsentrasi substrat. pH penting dalam penelitian ini karena berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Menurut penelitian Sulthoniyah, dkk (2015) pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease tertinggi diperoleh pada pH 7 sebesar 1,9259 U/mL yang dihasilkan oleh bakteri *Lactobacillus plantarum*. Berdasarkan penelitian Afriani, dkk (2018) aktivitas enzim protease tertinggi diperoleh pH 7 menghasilkan aktivitas sebesar 155 U/mL oleh bakteri *Pediococcus pentosaceus*. Menurut Karthikeyan, dkk (2018) *Lactobacillus delbrueckii* mempunyai aktivitas enzim protease tertinggi pada pH 7 sebesar 19,89 U/mL.

Konsentrasi substrat termasuk faktor penting dalam penentuan aktivitas enzim karena meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat semakin banyaknya substrat yang terikat dengan enzim. Berdasarkan penelitian Festus, dkk (2019) pengaruh konsentrasi substrat (kasein) terhadap aktivitas enzim protease tertinggi diperoleh pada konsentrasi 1% yaitu 20 U/mL yang dihasilkan oleh bakteri *Pediococcus acidilactici*. Menurut Onilude dan

Oke (2014) aktivitas enzim protease tertinggi pada konsentrasi substrat (kasein) 2% sebesar 100 U/mL dihasilkan oleh bakteri *pediococcus acidilactici*. Hasil penelitian Afriani, dkk (2018) pengaruh konsentrasi substrat (kasein) terhadap aktivitas enzim protease tertinggi pada konsentrasi 2,5% sebesar 88,4 U/mL yang dihasilkan oleh bakteri *Pediococcus pentosaceus*.

Weissella confusa adalah salah satu bakteri yang menghasilkan enzim protease dengan menghidrolisis protein menjadi asam amino. Bakteri merupakan makhluk ciptaan Allah SWT. Untuk menghasilkan enzim protease harus mengetahui tempat pertumbuhannya (penyimpanannya) dengan suhu dan pH tertentu. Enzim protease dibutuhkan oleh makhluk hidup untuk metabolisme tubuh dalam memecah protein menjadi senyawa yang sederhana. Penjelasan tentang makhluk Allah SWT yang tidak terlihat dijelaskan dalam QS Al-Baqarah Ayat 26 berbunyi:

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

Artinya : “*Sesungguhnya Allah tiada malu membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: “Apakah Allah SWT menjadikan ini untuk perumpamaan?”. Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah SWT dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberinya petunjuk dan tidak ada yang disesatkan Allah SWT kecuali orang-orang yang fasik”.*

Berdasarkan tafsir Al Misbah menerangkan tentang perempumaan karena Sesungguhnya Allah tiada malu membuat perumpamaan seperti nyamuk atau yang melebihinya yaitu lebih rendah atau lebih besar dari nyamuk. Allah SWT tidak malu memberikan perumpamaan tentang nyamuk kecil yang diremehkan dan

dianggap tidak penting. Terkandung dalam lafadz *فَمَا فَوْقَهَا* *fama fauqoha* “ atau yang lebih rendah dari itu (Sihab, 2002).

Penelitian ini menggambarkan bahwa terdapat makhluk ciptaan Allah SWT yang memiliki ukuran sangat kecil dibandingkan nyamuk salah satunya mikroorganisme. Mikroorganisme memiliki bentuk dan ukuran yang relatif kecil sehingga tidak dapat dilihat oleh mata secara langsung untuk dapat melihat membutuhkan alat seperti mikroskop, salah satu mikroorganisme yaitu bakteri. Bakteri merupakan mikroorganisme uniseluler, tidak memiliki klorofil dan berukuran renik (mikroskopik). Bakteri tersebar luas dibandingkan makhluk hidup lainnya. Beberapa bakteri ada yang menguntungkan dan merugikan.

Berdasarkan latar belakang diatas dapat diketahui bahwa dengan menggunakan isolat bakteri *Weissella confusa* dan diberi perlakuan yang berbeda maka akan memiliki aktivitas enzim protease yang berbeda pula. Selain itu, minimnya penelitian mengenai aktivitas enzim protease bakteri *Weissella confusa* menjadikan penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim protease yang dipengaruhi oleh pH dan konsentrasi substrat.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini dapat dipaparkan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini dapat di paparkan sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*.
2. Mengetahui pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Enzim protease yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari *Weissella confusa*.
2. Variasi pH yang digunakan adalah 5, 6, 7, dan 8.
3. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,5%; 1%; 2,5%; dan 3,5%.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh pH dan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Enzim protease dihasilkan dari tumbuhan, hewan, dan bakteri karena waktu untuk beregenerasi lebih pendek, materi genetik dapat dimanipulasi dengan mudah dan kondisi kultur dapat dioptimalkan dengan mudah. Produksi enzim protease dari bakteri dipengaruhi oleh sumber karbon, nitrogen dan parameter seperti pH, suhu inkubasi, dan waktu inkubasi. Jumlah enzim protease yang diproduksi secara maksimal dapat dilakukan dengan pemilihan media yang baik (Francois, 2014). Salah satu mikroorganisme penghasil enzim protease adalah *Weissella confusa*. *Weissella confusa* termasuk bakteri asam laktat.

Bakteri asam laktat dapat bertindak sebagai probiotik, bersifat non patogen, menghasilkan asam laktat, kelompok jenis bakteri gram positif, berbentuk *coccus* (bulat) atau *bacillus* (batang), tidak membentuk spora, dan juga memiliki kemampuan menfermentasikan gula menjadi asam laktat. Selain itu, bakteri asam laktat bersifat anaerob tetapi mampu menerima adanya oksigen dan metabolisme karbohidrat dengan jalur fermentasi (Yousef, 2003). Bentuk dari bakteri asam laktat mempunyai partikel putih yang merupakan dari koloni bakteri. Beberapa macam bakteri asam laktat seperti *Streptococcus sp*, *Lactobacilli*, beberapa jenis khamir non patogen, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* dan ragi (Ismail, dkk, 2018).

Bakteri asam laktat (BAL) diisolasi dari makanan fermentasi. BAL telah lama digunakan untuk meningkatkan rasa, mempermudah pencernaan dan

penyerapan, serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan aktivitas antioksidan pada daging fermentasi (Liu, dkk, 2020). Dalam keamanan pangan, bakteri asam laktat termasuk pada kategori *General Recognized as Safe* (GRAS) sehingga aman berada dalam suatu produk pangan (Mahulette, dkk, 2016).

Kecepatan pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh pH, untuk pertumbuhan bakteri juga terdapat rentang pH dan pH optimal. Pada bakteri patogen pH optimalnya 7,2 – 7,6. Besarnya pertumbuhan bakteri dibatasi oleh produk metabolitnya yang dihasilkan mikroorganisme. beberapa macam pertumbuhan bakteri yang dipengaruhi pH seperti : (Rini, 2020).

- a. Asidofil, tumbuh pada kisaran pH 2-5
- b. Neutrofil, tumbuh pada kisaran pH 5,5-8
- c. Alkalofil, tumbuh pada kisaran pH 8,4-9

2.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan mikroorganisme dari awal pertumbuhan sampai kematian di tunjukkan dengan kurva pertumbuhan. Tahap pertumbuhan bakteri terdiri atas empat fase antara lain fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Rini, 2020).

2.2.1 Fase lag

Fase lag disebut juga fase adaptasi. Pada fase ini perubahan bentuk dan pertumbuhan jumlah individu belum terlihat jelas. Mikroba beradaptasi untuk menyesuaikan diri dengan substrat dan kondisi lingkungan sekitar. Waktu yang dibutuhkan untuk beradaptasi sekitar 5 menit sampai berjam-jam. Dalam fase ini

belum terjadi pembelahan sel karena enzim belum disintesis. Waktu yang diperlukan adaptasi lama karena dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

a. Jumlah sel

Apabila jumlah sel yang dipindahkan banyak maka akan berjalan dengan cepat, tetapi jumlah sel yang dipindahkan sedikit maka akan berjalan lambat.

b. Lingkungan pertumbuhan

Apabila mikroba dipindahkan dari medium dan lingkungan yang sama seperti sebelumnya maka waktu adaptasi yang diperlukan akan cepat, namun jika medium dan lingkungan yang baru berbeda dengan medium dan lingkungan sebelumnya maka membutuhkan waktu beradaptasi yang lama.

2.2.2 Fase logaritmik atau Eksponensial

Fase eksponensial mulai terjadi perubahan bentuk, pembelahan sel dengan cepat dan peningkatan jumlah sel secara maksimum. Peningkatan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kandungan sumber nutrisi sebagai bahan makan mikroba. Pada fase ini membutuhkan energi yang lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya.

2.2.3 Fase Stasioner

Fase stasioner merupakan fase keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian sel. Pada fase ini sumber nutrisi mulai berkurang. Mikroba tidak bisa melakukan aktivitas pertumbuhannya karena nutrisi untuk mikroba mulai habis sehingga akan terbentuk produk yang dapat mengakibatkan pertumbuhan sel melambat menyebabkan jumlah sel yang hidup seimbang dengan jumlah sel yang mati. Kepadatan bakteri dalam fase ini mencapai kepadatan yang maksimal.

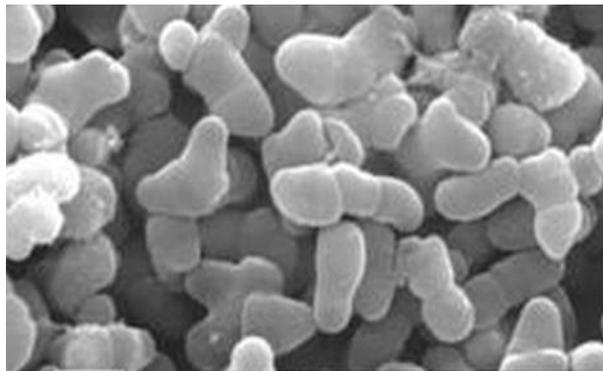
Kemudian dalam fase ini ukuran sel lebih kecil hal ini dikarenakan sel tetap tumbuh dengan nutrisi yang mulai habis.

2.2.4 Fase Kematian

Fase kematian ini terjadi karena nutrisi sudah habis, energi cadangan di dalam sel habis, proses metabolisme berhenti, laju kematian meningkat dan ada kemungkinan sel dihancurkan oleh pengaruh enzim yang berasal dari sel itu sendiri sehingga menyebabkan mikroba tidak mampu lagi bertahan hidup dan mengalami kematian.

2.3 Bakteri *Weissella confusa*

Selama 20 tahun terakhir, para ilmuwan melakukan penelitian untuk genus *Weissella*. *Weissella* diusulkan sebagai genus pada tahun 1993 dari klasifikasi *Lactobacillus* dan *Leuconostoc spp.* Bakteri ini banyak terdeteksi pada makanan fermentasi (Fessard dan Remiz, 2017). Adapun klasifikasi bakteri *Weissella confusa* menurut Fusco (2015) dan bentuk bakteri ditunjukkan Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Bakteri *Weissella confusa*

Filum : *Firmicutes*
Kelas : *Bacilli*
Ordo : *Lactobacillales*
Famili : *Leuconostocaceae*
Genus : *Weissella*
Spesies : *Lactobacillus*

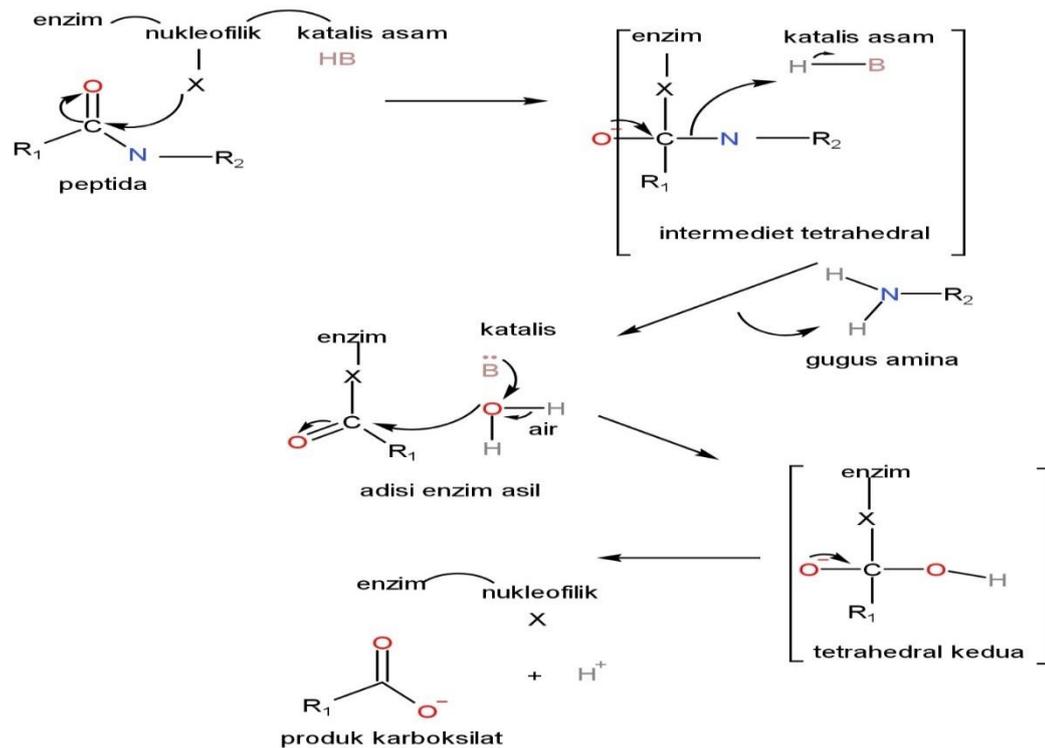
Pertama kali genus *Weissella* diusulkan oleh Collins dkk (1993) berdasarkan hasil analisis filogenetik 16S rDNA, genus *Weissella* secara filogenetik bakteri asam laktat dan mencakup dua belas spesies mirip *Lueconostoc* yang divalidasi saat ini termasuk *W. confusa* (untuk sebelumnya *Lactobacillus confusus*), *W. minor* (sebelumnya *Lacto bacillus minor*), *W. kandleri* (sebelumnya *Lactobacillus kandleri*), *W. halotolerans* (sebelumnya *Lactobacillus halotolerans*), *W. viridescens* (sebelumnya *Lactobacillus viridescens*), *Weissella paramesenteroides* (sebelumnya *Leuconostoc paramesenteroides*), *W. hellenica*, *W. thailandensis*, *W. cibaria*, *Weissella kimchii*, dan *Weissella koreensis*. *Weissella confusa* merupakan salah satu spesies *Weissella* yang paling tersebar luas dalam makanan, strain spesies ini terbukti bertindak sebagai probiotik dan teknologi (Fusco, 2011). Selain itu, *Weissella spp* termasuk starter kuat yang potensial untuk fermentasi makanan (Fessard dan Remize, 2017).

Bakteri *W. confusa* menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir primer dari fermentasi karbohidrat. Spesies *Weissella* digunakan dalam produk berbagai makanan dan minuman yang difermentasikan, selain itu juga digunakan sebagai probiotik. BAL banyak diggunakan pada bidang bioteknologi dan industri makanan karena selain asam laktat, bakteri asam laktat menghasilkan senyawa penting seperti etanol, karbon dioksida, bakteriosin, eksopolisakarida (EPS), oligosakarida, enzim proteolitik dan senyawa aromatik (Fessard dan Remize, 2017). Spesies *Weissella* dikategorikan sebagai bakteri asam laktat (BAL) dan tersebar luas dalam makanan fermentasi. Selain itu, *Weissella* berpotensi sebagai antikanker, antiradang, antibakteri, antijamur dan daya tahan tubuh (Kang, dkk 2016).

2.4 Enzim Protease

Protease merupakan salah satu enzim kompleks yang dapat diterapkan dalam produk komersial dan mempercepat pemecahan ikatan peptida pada polipeptida dan protein menggunakan reaksi hidrolisis, sehingga membuatnya menjadi ikatan yang lebih sederhana (Baehaki, 2019). Untuk mengetahui bakteri penghasil enzim protease dapat dilakukan dengan menggunakan media yang mengandung nutrisi seperti susu skim. Susu skim dihasilkan dari penghilangan sebagian lemak dan air yang dipasteurisasi untuk mendeteksi aktivitas proteolitik dan sebagai substrat protein (Perwendha, 2020). Susu skim memiliki kandungan berupa kasein, kalsium, potasium, magnesium, dan fosfor. Penggunaan media susu skim menurut Sarjono, dkk (2022) karena susu skim mengandung kasein yang dapat dipecah oleh mikroorganisme proteolitik terjadi kekeruhan media yang menunjukkan adanya aktivitas enzim. Protease akan mendegradasi kasein dengan memutus ikatan peptida (CO-NH) yang terjadi akibat masuknya air ke dalam molekul.

Umumnya bakteri dapat menghasilkan enzim seperti protease pada fase eksponensial. Pada fase ini merupakan fase perbanyakan sel dengan bakteri melakukan konsumsi nutrisi untuk memenuhi kebutuhannya. Sehingga menyebabkan berbagai macam proses fisiologis terjadi pada fase ini. Nutrisi pada bakteri dapat diperoleh dengan menghasilkan enzim protease yang memecah protein menjadi asam amino. Enzim protease berfungsi melembekkan, melembutkan atau menurunkan gluten yang membentuk protein. (Sarjono, dkk, 2022). Adapun reaksi hidrolisis enzim protease ditunjukkan pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Mekanisme umum hidrolisis enzimatis substrat peptida (Moran, dkk., 1994)

Mekanisme hidrolisis enzim, dimana enzim bertindak sebagai nukleofilik yang bereaksi dengan peptida untuk menghasilkan zona bening dengan dibantu katalis asam. Nukleofilik menyerang atom karbon karbonil, sehingga ikatan phi antara C dan O berpindah menjadi PEB atom O membentuk intermediet tetrahedral 1. Intermediet tetrahedral 1 PEB atom O kembali membentuk karbonil, dengan melepaskan produk amina yang dibantu oleh katalis asam. PEB pada katalis asam yang kehilangan H mengikat H^+ dari molekul air. PEB atom O pada molekul air mengikat atom C di karbonil dan elektron ikatan phi menuju atom O, sehingga membentuk intermediet 2. PEB atom O kembali membentuk ikatan phi dengan karbonil, elektron ikatan sigma nukleofil dan C menuju nukleofil sehingga terbentuk senyawa asam karboksilat.

2.5 Tirosin

Tirosin merupakan salah satu dari dua puluh asam amino yang akan dianalisis dari enzim protease hal ini karena keberadaan dari cincin benzena. Cincin aromatik memberikan sifat hidrofobik untuk tirosin menyebabkan tirosin tidak memiliki interaksi terhadap air dan lingkungan dan berada di dalam inti protein. Tirosin akan berinteraksi dengan lingkungan luar setelah aktivitas proteolitik pada molekul protein sehingga dapat dideteksi. Cincin aromatik yang terkonjugasi menyebabkan tirosin mampu menyerap sinar UV secara maksimal (Jin, 2016).

Metode pengujian menggunakan substrat kasein. Ketika kasein dihidrolisis oleh protease, peptida terlarut dengan asam trikloroasetat (TCA). Peptida ini mengandung tirosin dan residu triptofan, asam amino tirosin dibebaskan dengan asam amino dan peptida lainnya yang bereaksi dengan reagen *folin ciocalteu* untuk menghasilkan perubahan warna. Reagen ini juga akan bereaksi dengan peptida mengandung residu sistein, dan histidin tetapi lebih kecil. Perhitungan aktivitas enzim protease satu unit dapat diketahui sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghidrolisis kasein melepas 1 mol tirosin mL^{-1} menit⁻¹. Kurva standar tirosin digunakan untuk menentukan jumlah tirosin yang dilepas. Aktivitas dihitung dengan membagi unit enzim (U/mL) (Mustaq, dkk, 2020).

2.6 Uji Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas protease ditentukan menggunakan uji kaseinolitik karena pengujiannya memanfaatkan kasein sebagai substrat dan uji kolorimetrik karena menggunakan reagen *folin ciocalteu*. Prinsip kolorimetrik, reaksi oksidasi dan reduksi dimana gugus fenolik-hidroksil yang terdapat pada tirosin bereaksi dengan reagen *folin ciocalteu* membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat

menghasilkan larutan berwarna biru (Nizar, 2015). Keberadaan bakteri dapat dideteksi menggunakan spektrofotometri berada pada daerah cahaya visible dengan panjang gelombang 400-700 nm yang efektif untuk mengetahui keberadaan bakteri (Kim, 2013). Reaksi hidrolisis dapat dihentikan dengan penambahan larutan TCA (asam trikloroasetat) menyebabkan enzim dan sisa substrat menjadi terdenaturasi, kecuali produk hasil hidrolisis yang memperoleh asam amino (Cappucino dan Sherman, 2005)

Menurut Rodarte, dkk (2011) kasein termasuk substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease. Menurut Kant (2016) substrat kasein memiliki aktivitas enzim protease sebesar 1,6 U sedangkan untuk gelatin dengan aktivitas enzim protease sebesar 0,6 Unit dan keratin sebesar 1,2 Unit. Hasil tersebut diketahui jika substrat kasein dalam menghidrolisis enzim protease lebih tinggi dibandingkan dengan gelatin dan keratin. Dalam menghidrolisis enzim terjadi pemutusan ikatan peptida sehingga melepaskan asam amino.

Aktivitas enzim protease dapat diidentifikasi menggunakan metode modifikasi Bragmeyer and Grassi (1983) dengan menggunakan kasein sebagai substrat. Prinsip pengukurannya dengan menghidrolisis substrat oleh enzim protease menjadi asam amino dan peptida. Asam amino yang diperoleh dari hidrolisis kasein oleh protease dipisahkan menggunakan TCA (*Trichloro acetic acid*). Peningkatan hidrolisis disebabkan oleh peningkatan peptida dan asam amino yang terlarut dalam TCA akibat pemutusan ikatan peptida selama hidrolisis (Hanslaniza, 2010). Secara umum, pengendapan protein dengan TCA dikelompokkan menjadi beberapa golongan berdasarkan konsentrasi TCA yang digunakan. Pada konsentrasi TCA dibawah 5% (w/v) terjadi peningkatan

keasaman sehingga jumlah protein yang mengendap mulai meningkat. Ketika konsentrasi TCA antara 5-45% (w/v) menyebabkan protein mengendap dalam jumlah maksimal. Apabila konsentrasi TCA lebih dari 45% (w/v) menyebabkan terjadi penurunan jumlah protein yang mengendap secara drastis (Rajalingan, dkk, 2009).

Tahap pemisahan asam amino dengan protein atau substrat yang belum terhidrolisis pada waktu inkubasi menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Hasil dari sentrifugasi diperoleh supernatan. Supernatan yang terbentuk tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease. Kemudian ditambahkan Na_2CO_3 untuk memberikan suasana basa dalam supernatan. Pereaksi *folin ciocalteu* ditambahkan sehingga warna terbentuk menjadi biru. Larutan diukur menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu. Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim.

Analisis hasil uji aktivitas enzim protease menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap merupakan keragaman atau variasi hanya disebabkan oleh perlakuan yang dicobakan dan perlakuan tersebut merupakan satu faktor. Rancangan ini dikatakan acak karena setiap satuan percobaan mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan sedangkan dikatakan lengkap karena seluruh perlakuan yang dirancang dalam percobaan tersebut digunakan. Misal faktor yang ingin dikaji pengaruhnya adalah pH. Perlakuan yang dicobakan adalah pH 1 (P_1), pH 2 (P_2) dan pH 3 (P_3). Kemudian faktor yang diluar perlakuan atau faktor lingkungan pada unit percobaan dikondisikan serbasama (homogen) kemudian penempatan perlakuan dalam

percobaan dilakukan secara acak dan lengkap (Harsujuwono, 2011). Adapun langkah-langkah analisa menggunakan One way Anova :

- a. Input data ke data *views* SPSS.
- b. Klik *analyze*, kemudian pilih *compare means* dan pilih *one way anova*.
- c. Kemudian input hasil ke dalam *dependent list* dan pH ke kolom faktor.
- d. Klik *options* kemudian centang *descriptive*.
- e. Klik *post hoc*, selanjutnya centang *LSD* atau *Tukey* dan klik *continue*.

2.7 Faktor yang mempengaruhi Aktivitas Enzim

Kemampuan enzim protease dalam menghidrolisis protein dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH dan konsentrasi substrat.

2.7.1 pH

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH tertentu dimana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk meningkatkan substrat. Apabila konsentrasi ion hidrogen berubah aktivitas enzim secara progresif hilang sampai akhirnya enzim menjadi tidak fungsional (Lehninger, 1997).

Berdasarkan penelitian Khusnati dan Nanda (2019) aktivitas enzim protease dipengaruhi pH 4,5 memperoleh aktivitas sebesar 0,4230 U/mL yang dihasilkan bakteri *Lctobacillus plantarum* B110. Penelitian terdahulu yang dilakukan Afriani, dkk (2018) aktivitas enzim protease yang dipengaruhi pH 6 menghasilkan aktivitas sebesar 15 U/mL oleh bakteri *Pediococcus pentasaceus*. Menurut penelitian Karthikeyan, dkk (2018) aktivitas enzim protease yang

dipengaruhi oleh pH 7 menghasilkan aktivitas sebesar 155 U/mL dari bakteri *Lctobacillus delbrueckii*.

Berdasarkan hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa semakin tinggi pH maka aktivitas enzim protease yang diperoleh semakin tinggi hal ini karena sisi aktif enzim masih dapat berinteraksi dengan pH sehingga menghasilkan aktivitas enzim protease optimum, namun pH dapat mengalami penurunan karena sisi aktif enzim telah banyak yang bereaksi dengan pH sehingga aktivitas enzim protease mengalami penurunan. Selain itu, dikarenakan adanya perubahan keadaan ion enzim dan substrat pada bagian gugus fungsional. Perubahan gugus fungsional menyebabkan sulitnya enzim dan substrat untuk berinteraksi, sehingga reaksi mengalami penurunan.

Menurut penelitian Tazkia (2017) penurunan aktivitas enzim protease dipengaruhi oleh perubahan struktur tersier yang menyebabkan bagian hidrofobik yang semula tersimpan di dalam molekul menjadi terbuka. Sehingga kelarutan enzim berkurang. Berkurangnya kelarutan enzim menyebabkan penurunan aktivitas enzim secara perlahan. Menurut Wardani (2012) enzim memiliki konformasi sisi aktif yang sesuai dengan substrat kasein dan terbentuk enzim substrat maksimal, sehingga menghasilkan produk yang maksimal juga.

Menurut teori palmer (1995) penurunan aktivitas enzim protease disebabkan sebagai akibat dari perubahan bentuk, sifat muatan enzim dan substrat. Perubahan pH menyebabkan perubahan keadaan ionisasi asam amino dalam protein yang mengalami perubahan ikatan ionik menentukan struktur tersier dan sifat muatan protein. Hal ini menyebabkan inaktivasi enzim dan mengubah pengenalan substrat. Perubahan pH akan mengakibatkan enzim mengalami

denaturasi karena adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3 dimensi enzim (Baehaki, dkk., 2008).

2.7.2 Konsentrasi substrat.

Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat semakin banyak substrat yang terikat dengan enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik jenuh tidak dapat lagi meningkatkan kecepatan laju reaksi, hal ini dikarenakan sisi aktif enzim telah jenuh (Pratiwi, 2008).

Menurut penelitian Karthikeyan, dkk (2018) aktivitas enzim protease yang dipengaruhi konsentrasi substrat kasein 0,4% menghasilkan aktivitas enzim sebesar 50 U/mL oleh bakteri *Lactobacillus delbrueckii*. Menurut Onilude dan Oke (2014) aktivitas enzim pada konsentrasi substrat kasein 1% sebesar 60 U/mL dihasilkan oleh bakteri *Pediococcus acidilactici*. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Afriani, dkk (2018) aktivitas enzim protease yang dipengaruhi oleh konsentrasi substrat kasein 2,5% menghasilkan aktivitas sebesar 20 U/mL dari bakteri *Pediococcus pentasaceus*. Hasil dari penelitian terdahulu menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat aktivitas enzim protease mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan terjadi perubahan bentuk pada bagian sisi aktif enzim, sehingga untuk berikatan dengan substrat sudah mengalami kejenuhan dan aktivitas enzim protease mengalami penurunan. Menurut sharma (2013) konsentrasi yang meningkat dapat mengakibatkan kejenuhan enzim.

2.8 Spektrofotometer

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuarsa yang dinamakan kuvet. Sebagian cahaya akan terserap dan sisanya akan dilewatkan. Dimana nilai absorbansi dari cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan pada kuvet (Sastrohamidjojo, 2007). Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur panjang gelombang dari intensitas sinar ultraviolet dan sinar tampak yang dia bsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet pada panjang gelombang 200-400 nm sedangkan sinar tampak berada pada panjang gelombang 400-800 nm (Elsair, 2012). Untuk bakteri yang tidak berpigmen memiliki panjang gelombang antara 400-1000 nm (Cushia, dkk, 2021).

Prinsip kerja dari spektrofotometer UV-Vis adalah interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Radiasi elektromagnetik yang dipancarkan berupa partikel foton dimana 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 direkam dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang. Semakin rendah energi yang dibutuhkan elektron untuk bereksitasi maka semakin besar panjang gelombang yang diabsorbansi (Suhartati, 2017).

Densitas optik (OD) digunakan sebagai pengukuran konsentrasi biomassa yang tersuspensi. Pengukuran OD merupakan pengukuran yang paling umum digunakan di laboratorium mikrobiologi untuk menilai pertumbuhan mikroba secara kualitatif sebagai kekeruhan suatu kultur. Kekeruhan dinilai secara visual dari suatu kultur hanya merupakan perkiraan kasar dari konsentrasi sel (Myers,

dkk, 2013). Dalam analisis bakteri panjang gelombang yang sering digunakan adalah 600 nm, hal ini karena OD 600 nm panjang gelombang 600 nm digunakan untuk menentukan konsentrasi sel bakteri. Karena sel bakteri yang menyerap pada 600 nm mungkin tidak akan menyerap pada panjang gelombang lebih tinggi atau lebih rendah dari 600 nm (Buch, 2019).

Gabungan antara warna komplementer dan warna yang diabsorpsi akan menghasilkan cahaya putih. Bagi pengamat berkas cahaya yang diteruskan akan terlihat berwarna yang disebut warna komplementer (Khaldun, 2018).

Tabel 2.1 Spektrum cahaya tampak dan warna komplementer

Panjang gelombang (nm)	Warna	Warna Komplementer
400-435	Violet	Kuning-hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-biru	Oranye
490-500	Biru-hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning-hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Oranye	Hijau-biru
610-700	Merah	Biru-hijau

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang, Jawa Timur. Penelitian akan dilaksanakan mulai bulan September 2021.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan digunakan untuk pembuatan media *De Man Ragosa Sharpe Agar* (MRSA), *De Man Ragosa Sharpe Broth* (MRSB), dan *Skim Milk Broth* (SMB) adalah erlenmeyer, seperangkat alat autoklaf, *hot plate*, botol, gelas ukur, timbangan, stirer, kapas dan plastik *wrap*. Pembuatan buffer menggunakan alat seperti labu ukur 100 mL, batang pengaduk, timbangan, spatula, botol, *yellow tip*, pipet ukur 25 mL, mikropipet, pipet tetes, beaker gelas dan seperangkat alat pH, sedangkan pembuatan konsentrasi substrat menggunakan timbangan, spatula, labu ukur 25 mL, botol dan pipet tetes. Peremajaan menggunakan jarum ose, bunsen, tabung reaksi. Sedangkan alat untuk pembuatan inokulum adalah jarum ose, bunsen dan botol. Untuk produksi dan ekstraksi enzim protease menggunakan alat yaitu botol, shaker inkubator, seperangkat alat sentrifugasi, kawat ose, mikropipet, tabung reaksi, tabung sentrifugasi dan pipet. Pembuatan kurva tirosin membutuhkan alat seperti timbangan, beaker gelas, pipet ukur 10 mL, seperangkat alat spektrofotometer, tabung reaksi, *blue tip*, mikropipet, labu ukur 100 mL, labu ukur 10 mL, pipet tetes dan rak tabung reaksi. Uji aktivitas enzim protease

menggunakan alat yaitu *blue tip*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet ukur 10 mL, mikropipet, inkubator, sentrifugasi, tabung sentrifugasi dan seperangkat alat spektrofotometer.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk peremajaan bakteri seperti media *De Man Ragosa Sharpe Agar* (MRSA). Pembuatan buffer menggunakan bahan seperti asam sitrat, Na-sitrat, Na_2HPO_4 , $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan aquades, sedangkan pembuatan substrat menggunakan kasein dan aquades. Pembuatan inokulum menggunakan media *De Man Ragosa Sharpe Broth* (MRSB) dan isolat bakteri *Weissella confusa*. Produksi dan ekstraksi enzim protease membutuhkan bahan seperti media *Skim Milk Broth* (SMB) sebanyak 25 mL, inokulum bakteri sebanyak 25 mL, dan aquades,. Pembuatan kurva standar tirosin membutuhkan bahan seperti tirosin 100 mg/L, Na_2CO_3 0,5 M sebanyak 2,5 mL, reagen *Folin Ciocalteu* sebanyak 0,5 mL dan tirosin sebanyak 1 mL. Bahan yang digunakan untuk mengetahui pengaruh aktivitas enzim protease terhadap pH adalah ekstrak kasar enzim 1 mL, kasein 2% sebanyak 1 mL, buffer asam sitrat pH 5 dan 6, sedangkan buffer fosfat 7 dan 8 sebanyak 1 mL, *Trichloroasetat Acid* (TCA) 0,4 M sebanyak 1 mL, Na_2CO_3 0,5 M sebanyak 2,5 mL, reagen *Folin Ciocalteu* sebanyak 0,5 mL, sedangkan untuk uji aktivitas enzim protease terhadap konsentrasi substrat menggunakan bahan yang sama seperti uji aktivitas enzim protease sebelumnya dengan variasi konsentrasi substrat yaitu 0,5%, 1%, 2,5%, dan 3,5%.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik terdiri dari dua tahap. Tahap pertama untuk mengetahui pengaruh pH media terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* dengan variasi pH yang digunakan yaitu 5, 6, 7, dan 8. Penelitian tahap kedua untuk mengetahui konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* dengan variasi konsentrasi substrat meliputi 0,5 %, 1 %, 2,5 % dan 3,5 % yang dilakukan pada kondisi pH optimum hasil dari tahap pertama.

Rancangan penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengulangan tiga kali, adapun data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa aktivitas enzim protease.

Tabel 3.1 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease

pH	Aktivitas Enzim
6	
7	
8	
9	

Kondisi pH optimum ditunjukkan dengan aktivitas enzim tertinggi dan digunakan untuk perlakuan berikutnya.

Tabel 3.2 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease

Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas Enzim
0,5	
1	
2,5	
3,5	

3.4 Tahap Penelitian

1. Pembuatan media
2. Pembuatan buffer dan konsentrasi substrat
3. Regenerasi bakteri
4. Pembuatan inokulum
5. Pembuatan kurva standar tirosin
6. Produksi dan ekstraksi enzim protease.
7. Uji Aktivitas Enzim Protease.
 - a. Uji aktivitas enzim protease dengan variasi pH
 - b. Uji aktivitas enzim protease dengan variasi konsentrasi substrat
8. Analisa data

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media (Dash, 2017)

3.5.1.1 Media *De Man Ragosa Sharpe Agar* (MRSA)

MRSA ditimbang sebanyak 3,41 g dan ditambahkan 50 mL aquades. Dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.1.2 Media *De Man Ragosa Sharpe Broth* (MRSB)

MRSB ditimbang 5,22 g dan ditambahkan 100 mL aquades. Dipanaskan hingga larut, kemudian dimasukkan kedalam botol masing-masing 25 mL. Media disterilisasi dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.1.3 Media *Skim Milk Broth* (SMB)

SMB ditimbang sebanyak 1,4 g kemudian ditambahkan 100 mL aquades. Dipanaskan sampai larut, setelah itu dimasukkan ke dalam botol masing-masing 25 mL. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Buffer

Ditimbang asam sitrat sebanyak 2,101 g dan Na-sitrat sebanyak 2,941 g. Kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL dan ditandabatkan. Sehingga diperoleh larutan X adalah asam sitrat dan larutan Y yaitu Na- Sitrat. Pembuatan pH 5 dilakukan dengan dipipet larutan X sebanyak 20,5 mL dan ditambahkan larutan Y sebanyak 29,5 mL. Kemudian diencerkan pada labu ukur 100 mL dan diuji menggunakan pH meter. Untuk pembuatan pH 6 diberikan perlakuan yang sama seperti pH 5 dengan dipipet larutan X sebanyak 9,5 mL dan ditambahkan larutan Y sebanyak 41,5 mL.

Pembuatan pH 7 dan 8 dengan ditimbang Na_2HPO_4 sebanyak 2,839 g dan $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2,759 g. Selanjutnya dilakukan seperti pembuatan pH sebelumnya. Sehingga diperoleh larutan X yaitu Na_2HPO_4 dan larutan Y adalah $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Untuk pH 7 dipipet larutan X sebanyak 19,5 mL kemudian ditambahkan larutan Y sebanyak 30,5 mL, sedangkan untuk pH 8 dipipet larutan X sebanyak 2,65 mL dan ditambahkan larutan Y sebanyak 47,35 mL. Langkah selanjutnya dilakukan sesuai dengan pembuatan pH sebelumnya.

3.5.3 Pembuatan Substrat

Pembuatan konsentrasi substrat menggunakan kasein sebanyak 25 mL. Dalam setiap konsentrasi 0,5%, 1%, 2,5%, dan 3,5% ditimbang kasein sebanyak 0,125 g, 0,25 g, 0,625 g, dan 0,875 g. Kemudian dilarutkan menggunakan aquades.

3.5.4 Produksi dan Ekstraksi Enzim Protease

3.5.4.1 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan pengambilan isolat *Weissella confusa* menggunakan jarum ose. Kemudian isolat bakteri tersebut digoreskan ke dalam media MRSA miring. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil peremajaan digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.4.2 Pembuatan Inokulum Bakteri (Marnolia, 2016)

Pembuatan inokulum dilakukan dari hasil peremajaan yang kemudian diinokulasikan ke dalam media MRSB sebanyak 25 mL. Kemudian dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 16 jam pada suhu ruang. Setelah itu, diamati perubahan warna menjadi keruh yang menandakan pertumbuhan bakteri. Hasil dari inokulum ditentukan OD (*Optical Density*) dengan diambil 4 mL dan blanko MRSB tanpa inokulum diambil 4 mL yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Kemudian diukur pada panjang gelombang 600 nm dan hasil pengukuran OD disetarakan dengan 0,5. Hasil dari penyetaraan inokulum digunakan untuk produksi enzim protease.

3.5.4.3 Produksi Enzim Protease (Marnolia, 2016)

Produksi enzim protease menggunakan hasil penyetaraan inokulum. Kemudian dimasukkan 2,5 mL inokulum ke dalam tabung sentrifugasi steril dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh endapan. Endapan tersebut ditambahkan aquades steril dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit dan diambil endapannya. Endapan tersebut ditambahkan 1 mL media SMB ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian

diambil kembali menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam media SMB. Setelah itu, dishaker pada kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, hasil sentrifugasi didinginkan pada refrigador selama 10 menit. Diambil supernatan yang mengandung ekstrak kasar enzim protease. Hasil ekstrak kasar enzim protease digunakan untuk uji aktivitas enzim.

3.5.5 Kurva Standar Tirosin (Yusriah, 2013)

3.5.5.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Ditimbang 0,01 g tirosin dan ditambahkan aquades ke dalam beaker gelas. Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas. Sehingga diperoleh larutan stok 100 mg/mL. Kemudian dilakukan dengan dipipet 2 mL dari larutan stok, selanjutnya diencerkan sampai 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 20 mg/mL. Dari konsentrasi diambil 1 mL dan dimasukkan tabung reaksi. Ditambahkan 2,5 mL Na_2CO_3 0,5 M dan dihomogenkan. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL reagen *Folin Ciocalteu* dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm dan dicari panjang gelombang tertinggi. Hasil λ_{maks} digunakan untuk penelitian selanjutnya.

3.5.5.2 Pembuatan Kurva Standar Tirosin

Pembuatan kurva standar tirosin dilakukan dengan dipipet larutan stok 100 mg/mL dipipet sebanyak 1, 3, 5, 7 dan 9 mL kemudian diencerkan sampai 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 10, 30, 50, 70 dan 90 mg/mL. Setiap konsentrasi diambil 1 mL dan dimasukkan tabung reaksi. Kemudian langkah

selanjutnya diberi perlakuan yang sama seperti penentuan λ_{maks} . Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV pada λ_{maks} dari penelitian sebelumnya. Hasil absorbansinya dibuat persamaan linier dengan diinterpolasikan konsentrasi yang diukur dan digunakan untuk uji aktivitas enzim protease.

3.5.6 Uji Aktivitas Enzim Protease (Sumardi, dkk 2019)

3.5.6.1 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Pengukuran aktivitas protease dengan metode Bregmeyer & Grassi (1983) menggunakan kasein 2 % sebagai substrat. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease dilakukan dengan ditambahkan 0,5 mL larutan ekstrak kasar enzim protease, kemudian ditambahkan 1 mL buffer asam sitrat pada pH 5 dan 6, sedangkan buffer fosfat pada pH 7 dan 8. Selanjutnya ditambahkan kasein 2,0% sebanyak 1 mL dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan 1 mL trikloroasetat (TCA) 0,4 M. Disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit, hasil dari setrifugasi diambil 0,5 mL dan ditambahkan 2,5 mL Na_2CO_3 0,5 M. Ditambahkan 0,5 mL reagen *folin ciocalteu* dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C. Kemudian diukur nilai absorbansi pada λ_{maks} . Untuk blangko, sampel enzim diganti aquades dengan perlakuan yang sama. Hasil pH optimum digunakan untuk menentukan pengaruh konsentrasi substrat.

Aktivitas enzim protease dihitung dengan persamaan 3.2 (Simamora, dkk, 2020)

$$\text{Aktivitas Protease} = \frac{[\text{Tirosin}] \times V}{(P \times Q) \times Fp} \dots\dots\dots(3.2)$$

Dimana [tirosin] adalah konsentrasi asam amino yang diperoleh dari kurva standar ($\mu\text{mol/mL}$), V adalah volume total sampel pada setiap tabung (mL), q merupakan

waktu inkubasi (menit), p yaitu jumlah enzim hasil sentrifugasi (mL), dan Fp adalah faktor pengenceran dari kurva standar tirosin (mL). Hasil dari aktivitas enzim digunakan untuk uji selanjutnya dan dianalisis menggunakan SPSS.

3.5.6.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease dilakukan dengan diambil 0,5 mL larutan ekstrak kasar enzim protease. Kemudian ditambahkan dengan beberapa variasi konsentrasi substrat yaitu 0,5 %, 1 %, 2,5 % dan 3,5 %, sebanyak 1 mL dan ditambahkan pH tertinggi sebanyak 1 mL. Setelah itu, diberikan perlakuan yang sama seperti uji aktivitas enzim protease sebelumnya. Hasil dari uji aktivitas enzim protease terhadap konsentrasi substrat menggunakan SPSS.

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varians (One Way ANOVA) dengan program SPSS untuk mengetahui pengaruh pH dan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji tukey taraf 5%.

berwarna coklat kemerahan dan berbentuk cair berfungsi untuk pembuatan inokulum bakteri.

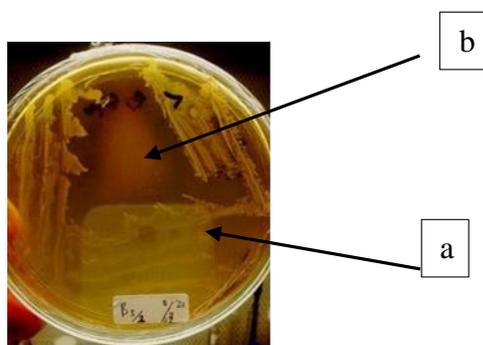
Pembuatan media dilakukan dengan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi dilakukan untuk membunuh kuman yang terdapat pada alat dan bahan. Menurut Darsan, dkk (2019) sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu tinggi dan tekanan tinggi yang diberikan kepada alat dan media berfungsi untuk membunuh kuman. Suhu yang digunakan untuk sterilisasi menggunakan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15-30 menit.

4.2 Regenerasi *Weissella confusa*

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Weissella confusa*. Isolat *Weissella confusa* diperoleh dari isolasi susu kacang tanah. Isolat tersebut disimpan didalam kulkas berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang menuju fase kematian. Isolat yang akan digunakan harus diregenerasi pada media MRSA. Hal ini dikarenakan untuk mengisolasi jenis bakteri asam laktat dan dapat melihat pertumbuhan bakteri karena memiliki bentuk padat. Berdasarkan Meganada dkk (2017) MRSA digunakan untuk memperbanyak, menumbuhkan dan mengisolasi bakteri asam laktat. Kandungan dari MRSA digunakan untuk pertumbuhan bagi bakterinya. Regenerasi dilakukan untuk pembaruan dan memperbanyak sel bakteri. Menurut Wijayati (2014) regenerasi bakteri dilakukan supaya bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyimpanan.

Regenerasi bakteri *Weissella confusa* dilakukan menggunakan jarum ose yang berpijar dengan api sampai berwarna merah. Hal ini dilakukan untuk meminimalisir kontaminasi dan membunuh mikroorganisme lainnya. Hasil dari

regenerasi diinkubasi selama 48 jam. Hal ini dilakukan karena bakteri memasuki fase lag. Pada fase ini bakteri beradaptasi dengan lingkungan untuk mempercepat pertumbuhan. Menurut Handayani, dkk (2016) pada fase lag sel bakteri sedang beradaptasi dengan substratnya dan sel bakteri mengalami pertumbuhan cepat atau memasuki fase logaritmik. Pada fase ini sel bakteri aktif untuk bermetabolisme dengan memanfaatkan substrat yang tersedia. Pada waktu ini bakteri dipanen dan diinokulasikan ke dalam media MRSB untuk pembuatan inokulum. Hasil regenerasi bakteri ditunjukkan pada Gambar 4.2



Gambar 4. 2 Regenerasi bakteri, dimana (a) *Weissella confusa* dan (b) media MRSA

Berdasarkan Gambar 4.2 menunjukkan pertumbuhan *Weissella confusa* setelah 48 jam yang ditandai dengan adanya serat berwarna putih pada media pertumbuhannya.

4.3 Pembuatan Inokulum Bakteri

Inokulum merupakan mikroorganisme yang diinokulasikan ke dalam media fermentasi pada saat kultur mikroba berada pada fase pertumbuhan eksponensial (Rachman, 1989). Tujuan pembuatan inokulum adalah untuk menyediakan nutrisi bagi pertumbuhan sel sehingga akan diperoleh jumlah sel yang tinggi. Pembuatan inokulum bakteri menggunakan media MRSB untuk

regenerasi, memberi nutrisi dan pembuatan inokulum dalam fasa cair (Murwani, 2015). Hasil dari regenerasi digunakan untuk pembuatan inokulum yang dilakukan selama 16 jam. Selama 16 jam *Weissella confusa* masuk pada fase eksponensial karena mulai terjadi pembelahan sel dengan cepat dan peningkatan jumlah sel secara maksimum. Inokulum bakteri *Weissella confusa* ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4. 3 Inokulum bakteri *Weissella confusa* pada media MRSB

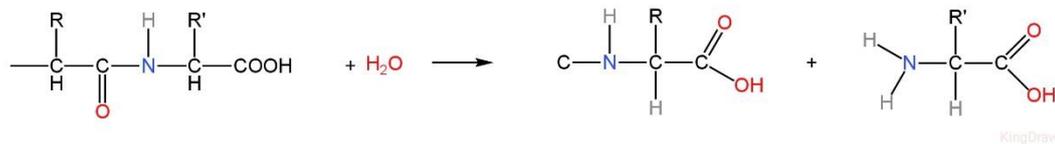
Berdasarkan Gambar 4.3 menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Weissella confusa* ditandai dengan kekeruhan pada media. Hasil inokulum diukur OD (*Optical Density*) pada panjang gelombang 600 nm. Pengukuran dilakukan untuk mengetahui kepadatan bakteri yang terlihat sebagai kekeruhan pada media. Diperoleh OD sebesar 2,0897 yang menunjukkan nilai kekeruhan pada inokulum. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan dari parameter kekeruhan media, dimana kekeruhan mempengaruhi banyaknya cahaya yang diserap oleh suspensi bakteri. Tingkat kekeruhan dalam inokulum berbanding lurus dengan jumlah mikroorganisme. Peningkatan kekeruhan media bakteri menunjukkan peningkatan jumlah mikroba. Cahaya yang ditransmisikan melalui media menurun dengan peningkatan dalam nilai absorbansi inokulum.

Hasil dari OD dilakukan penyetaraan sebesar 0,5. Inokulum *Weissella confusa* pada penelitian ini menggunakan OD 0,5 setara dengan jumlah bakteri $1,4 \times 10^9$ CFU/mL (Chalim, 2021). Selanjutnya, memisahkan sel dengan medianya menggunakan sentrifugasi sehingga diperoleh endapan. Endapan tersebut dicuci menggunakan aquades steril dan disentrifugasi kembali. Pencucian dilakukan bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang ikut terendap. Setelah dilakukan pencucian kemudian sel bakteri dimasukkan ke dalam media produksi enzim protease yaitu *Skim Milk Broth* (SMB).

4.4 Produksi Enzim Protease

Produksi enzim protease hasil dari pemisahan sel dengan mediumnya. Sel tersebut dimasukkan ke media produksi enzim kemudian dishaker selama 24 jam. Produksi enzim protease dilakukan selama 24 jam karena memasuki fase stasioner. Pada fase ini kepadatan bakteri mencapai kepadatan yang maksimal dengan ukuran sel lebih kecil hal ini disebabkan sel tetap tumbuh dengan nutrisi yang mulai habis. Sehingga pada fase ini jumlah sel yang hidup tetap konstan. Dalam pertahanan bakteri yang kekurangan nutrisi dengan menghasilkan metabolit sekunder berupa enzim. Pada fase tersebut terjadi proses enzimatik, dimana enzim menghidrolisis protein yang terkandung di dalam media menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino (Rahmi, dkk, 2020). Prinsip aktivitas enzim protease dengan menghidrolisis substrat oleh protease menjadi asam amino dan peptida. Substrat yang digunakan adalah kasein. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease kemudian dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan asam trikloroasetat (TCA) yang berfungsi untuk

menghentikan waktu inkubasi enzim dan mengendapkan asam amino yang tidak dapat terhidrolisis. Reaksi enzimatik diperoleh dari hidrolisis ikatan peptida dalam protein disajikan pada Gambar 4.4.



Gambar 4. 4 Reaksi hidrolisis kasein (ikatan peptida menjadi asam amino)

Berdasarkan Gambar 4.4 menjelaskan bahwa enzim protease menghidrolisis ikatan peptida. Setelah terjadi pemutusan ikatan peptida pada kasein yang terkandung dalam skim milk broth. Ikatan peptida terputus karena adanya air. Hasil dari pemutusan ikatan peptida adalah peptida dan asam amino.

Hasil dari pertumbuhan bakteri dalam media SMB disentrifugasi. Pada produksi enzim protease menggunakan SMB hal ini dikarenakan kandungan nutrisi yang banyak pada media SMB salah satunya kasein digunakan untuk sumber protein menghasilkan asam amino. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan filtrat dengan endapan. Setelah disentrifugasi filtrat dimasukkan ke dalam refrigerator selama 10-15 menit yang bertujuan untuk mengendapkan sel dan kasein yang tersisa. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji aktivitas enzim protease.

4.5 Kurva Standar Tirosin

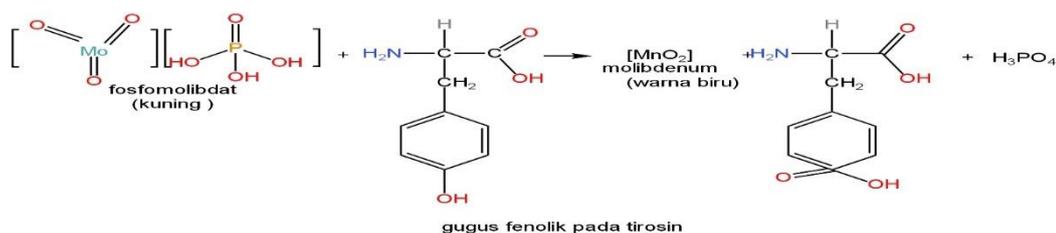
4.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maximum

Panjang gelombang maksimum dicari terlebih dahulu dikarenakan setiap instrument memiliki kesensitifan yang berbeda-beda. Pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 2 mg/L untuk menentukan panjang gelombang optimum dan diukur pada panjang gelombang 200-800 nm. Hasil yang diperoleh

menunjukkan panjang gelombang maksimum larutan tirosin adalah 750,1 nm. Sehingga panjang gelombang yang digunakan pada penelitian ini adalah 750,1 nm.

4.5.2 Penentuan Kurva Standar Tirosin

Penentuan aktivitas enzim protease langkah pertama yang dilakukan yaitu pembuatan kurva standar dengan menggunakan tirosin sebagai standar larutan. Dalam satu unit protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang setara dengan satu mikromol tirosin larut ke dalam TCA per menit dari kasein. Alasan penentuan aktivitas enzim protease menggunakan standar tirosin adalah kestabilan tirosin sebagai standar. Selain itu juga dikarenakan adanya kandungan fenolat dalam tirosin yang dapat bereaksi dengan reagen *folin ciocalteu*. Menurut Everette (2010) tirosin merupakan salah satu produk asam amino yang dapat bereaksi dengan reagen *folin ciocalteu*. Dalam bentuk sederhana reagen *folin ciocalteu* dapat mendeteksi tirosin dalam protein karena kandungan fenolik pada tirosin yang mampu mereduksi fosfomolibdat menjadi molibdenum. Adapun reaksinya ditunjukkan pada Gambar 4.5



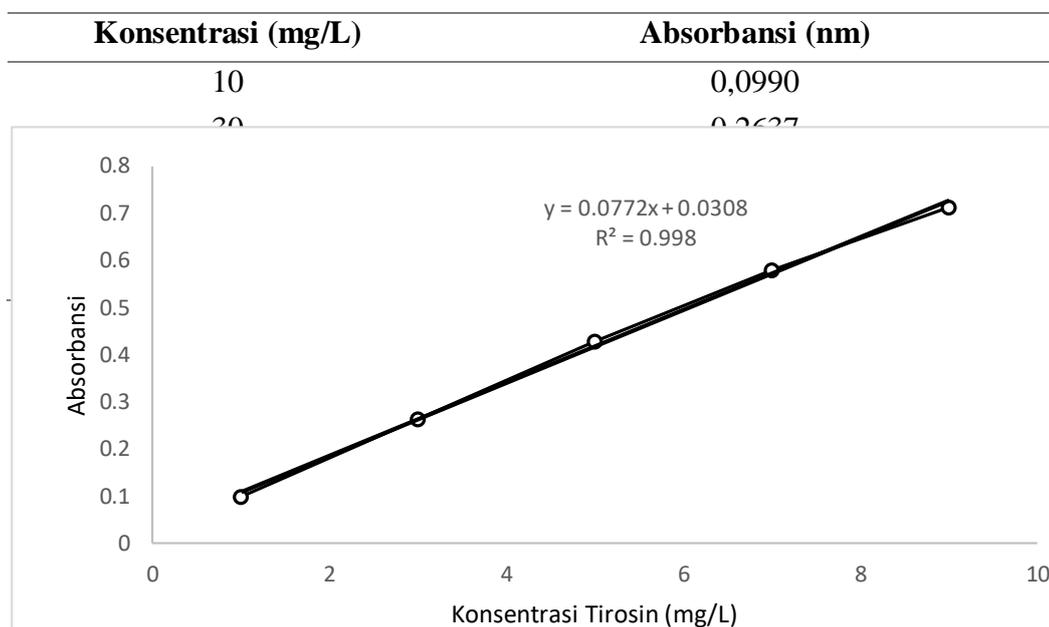
Gambar 4. 5 Reaksi antara *Folin ciocalteu* dengan tirosin

Hasil reaksi pada Gambar 4.5 menunjukkan bahwa reagen folin ciocalteu dapat mendeteksi adanya tirosin dalam protei. Hal tersebut dikarenakan gugus fenolik pada tirosin mampu mereduksi fosfomolibdat menjadi molibdenum. Reaksi

reduksi dan oksidasi pada gugus fenolik hidroksil pada tirosin dengan reagen *folin ciocalteu* membentuk molidenum. Dengan fosfomolibdat bertindak sebagai agen pereduksi gugus fenolik yang terdapat pada larutan, dimana gugus fenolik bertindak sebagai oksidator yang mengoksidasi fosfomolibdat menjadi molidenum yang merupakan senyawa kompleks berwarna biru (Nizar, 2015).

Penentuan kurva standar dilakukan karena untuk mengetahui konsentrasi dari suatu larutan. Menurut Yoga (2015) kurva standar memudahkan dalam mengetahui konsentrasi suatu senyawa dalam sampel. Hasil pengukuran absorbansi larutan tirosin dapat dilihat pada Tabel 4.1. Hasil dari absorbansi pada Tabel 4.1 digunakan untuk membuat kurva standar tirosin dengan memplotkan nilai absorbansi dan konsentrasi tirosin ditunjukkan Gambar 4.6

Tabel 4. 1 Absorbansi larutan standar tirosin



Gambar 4. 6 Kurva standar tirosin

Berdasarkan kurva standar tirosin pada Gambar 4.5 menunjukkan pengaruh konsentrasi tirosin terhadap absorbansi mengalami kenaikan hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi maka nilai absorbansi semakin tinggi. Sehingga diperoleh persamaan garis regresi linier yang digunakan untuk menyatakan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi larutan tirosin diperoleh $Y = 0,0772x + 0,0308$, dimana Y sebagai absorbansinya dan X sebagai konsentrasinya dengan $R^2 = 0,998$. Hasil persamaan garis regresi linier digunakan untuk menentukan konsentrasi tirosin sebagai asam amino yang berhasil terhidrolisis oleh enzim protease dari substrat kasein.

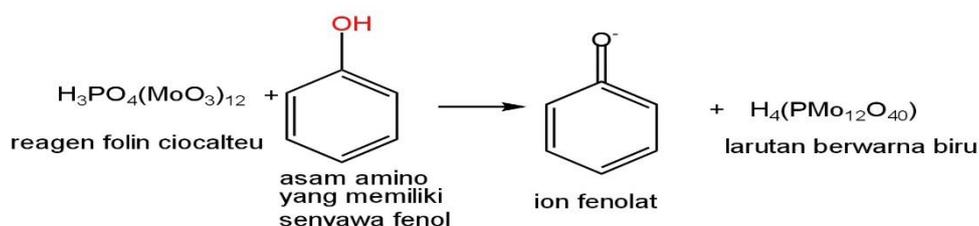
4.6 Uji Aktivitas Enzim Protease

4.6.1 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas enzim merupakan sebuah kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum (Lehninger, 1997). Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan dimasukkan 1 mL ekstrak kasar enzim ke dalam setiap variasi pH yaitu 5, 6,7, dan 8 dengan konsentrasi substrat 2%. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit untuk menghidrolisis enzim protease menjadi asam amino.

Setelah substrat terhidrolisis oleh enzim protease menjadi asam amino dan peptida, kemudian ditambahkan TCA. Penambahan TCA dilakukan untuk menghentikan reaksi waktu inkubasi karena ketika penambahan terjadi pemutusan ikatan peptida sehingga menyebabkan reaksi berhenti dan terjadi pembebasan asam amino. Menurut (Yusriah dan Nengah, 2013) TCA berfungsi menginaktifkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang

mengendap atau substrat yang belum terhidrolisis pada tahap ini terjadi inaktivasi protease. Kemudian untuk memisahkan hasil hidrolisis kasein oleh enzim protease menggunakan sentrifugasi. Setelah itu, disentrifugasi untuk pemisahan asam amino dengan protein atau substrat yang belum terhidrolisis, asam amino hasil hidrolisis akan larut dalam TCA sedangkan protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap sehingga diperoleh supernatan. Kemudian diambil 1 mL dan ditambahkan Na_2CO_3 untuk memberikan keadaan basa yang selanjutnya ditambahkan reagen *folin ciocalteu* sehingga menghasilkan warna biru. Menurut Benimana, dkk (2020) ketika protease menghidrolisis substrat menjadi asam amino, asam amino dibebaskan dengan asam amino lainnya dan pecahan peptida. Reagen *folin ciocalteu* bereaksi dengan asam amino bebas akan menghasilkan warna biru. Adapun reaksi antara reagen folin dengan asam amino ditunjukkan pada Gambar 4.7



Gambar 4. 7 Reaksi antara reagen *folin cicalteu* dengan asam amino

Berdasarkan gambar 4.7 menunjukkan bahwa asam amino yang memiliki senyawa fenolik dapat berperan dalam aktivitas enzim protease. Senyawa fenolik akan mengalami oksidasi membentuk ion fenolat, sedangkan reagen *folin ciocalteu* akan tereduksi membentuk kompleks fosfomolibdat dan membentuk kompleks molybdenum blue. Kemudian diinkubasi kembali selama 20 menit untuk

mereaksikan asam amino setelah pemutusan ikatan peptide yang direaksikan dengan reagen *folin ciocalteu*. Uji aktivitas enzim protease diukur absorbansinya pada panjang gelombang 750,1 nm. Diperoleh absorbansi aktivitas enzim protease ditunjukkan pada Tabel 4.2

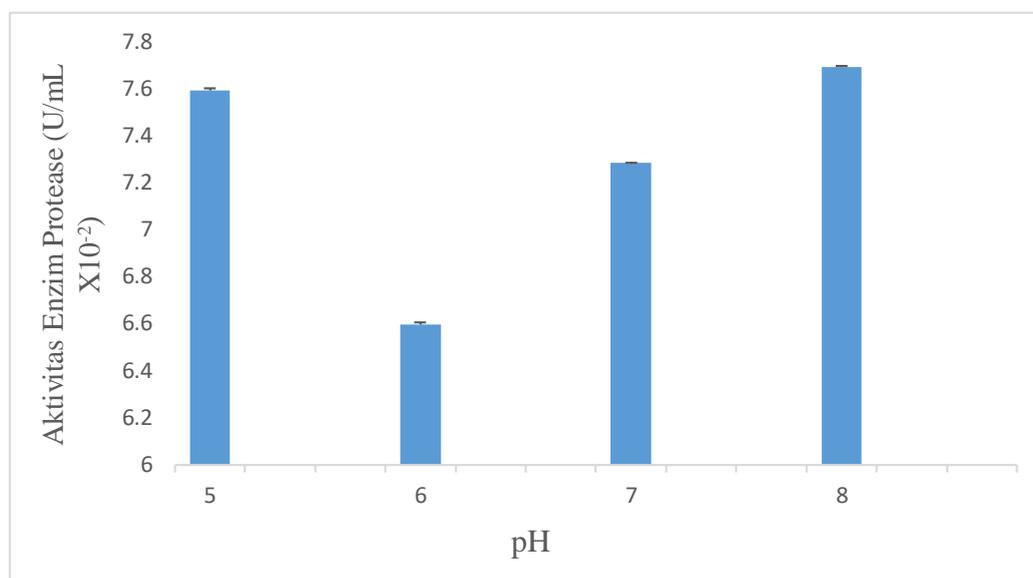
Tabel 4.2 Pengaruh aktivitas enzim protease terhadap pH

pH	Rata-Rata Aktivitas Enzim Protease (U/mL x 10⁻²)
5	7,592 ± 0,007
6	6,597 ± 0,006
7	7,284 ± 0,003
8	7,692 ± 0,007

Hasil dari Tabel 4.2 menunjukkan bahwa pada pH 6 mengalami penurunan sebesar $6,597 \times 10^{-2}$ U/mL kemudian terjadi kenaikan aktivitas enzim protease pada pH 8 sebesar $7,692 \times 10^{-2}$ U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease semakin meningkat pada pH 6-8. Menurut Lehninger (1997) aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi sisi aktif enzim. Setiap enzim memiliki pH optimum dimana pada pH tersebut strukturnya paling kondusif untuk meningkatkan substrat. Pada pH 6 mengalami penurunan hal ini disebabkan karena struktur dari enzim berubah menyebabkan substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga interaksi enzim dengan substrat tidak berlangsung dengan baik. Aktivitas enzim protease yang dipengaruhi pH ditunjukkan pada Gambar 4.8

Pengambilan keputusan dari pengujian ini dilakukan dengan melihat nilai F yang terdapat di dalam tabel ANOVA, tingkat signifikansi yang digunakan yaitu sebesar 0,05. Jika nilai signifikan $F < 0,05$ maka H^0 ditolak

dan H^1 diterima. Artinya semua variabel independent/bebas memiliki pengaruh secara signifikan terhadap variabel dependen atau terikat. Jika nilai signifikan $F > 0,05$ maka H^0 diterima dan H^1 Artinya, semua variabel independent atau bebas tidak memiliki pengaruh secara signifikan terhadap variabel dependen atau terikat (Gilang, 2019). Berdasarkan hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa nilai F hitung sebesar 2,150 lebih kecil dari F tabel yaitu 4,46 dengan probabilitas (Sig) sebesar 0,172 ($Sig > 0,05$), hal ini dapat diketahui bahwa pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease tidak memiliki pengaruh secara signifikan. Hal ini dapat disebabkan kemungkinan karena aktivitas enzim protease berada pada kondisi alkalofil. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease dapat disebabkan karena aktivitas enzim protease dapat aktif pada rentang pH yang luas.



Gambar 4. 8 Rata-rata aktivitas enzim protease pada berbagai pH

Berdasarkan Gambar 4.8 menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease tertinggi dari *Weissella confusa* ditunjukkan pada pH 8 karena sisi aktif enzim dapat berikatan pada substrat dengan baik, sehingga aktivitas dapat terjadi dengan

maksimal. Berdasarkan Punekar (2018) menyatakan bahwa setiap enzim memiliki

Konsentrasi Substrat (%)	Rata-Rata Aktivitas Enzim Protease (U/mL 10 ⁻²)
0,5	6,253 ^{bc} ± 0,005
1	6,701 ^c ± 0,002
2,5	4,685 ^a ± 0,007
3,5	5,336 ^{ab} ± 0,004

pH optimum yang mengarah pada aktivitas maksimum. Ketika pH optimum tercapai konformasi sisi aktif enzim sesuai dengan substrat sehingga dapat terjadi interaksi antara enzim dan substrat secara tepat.

4.6.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas enzim protease dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi substrat seperti 0,5%, 1%, 2,5% dan 3,5%. Uji aktivitas enzim protease ini menggunakan pH tertinggi yaitu pH 8 dari uji sebelumnya. Langkah untuk uji aktivitas enzim protease yang dipengaruhi oleh konsentrasi substrat sama seperti uji sebelumnya. Sehingga diperoleh nilai aktivitas enzim protease yang ditunjukkan pada Tabel 4.3

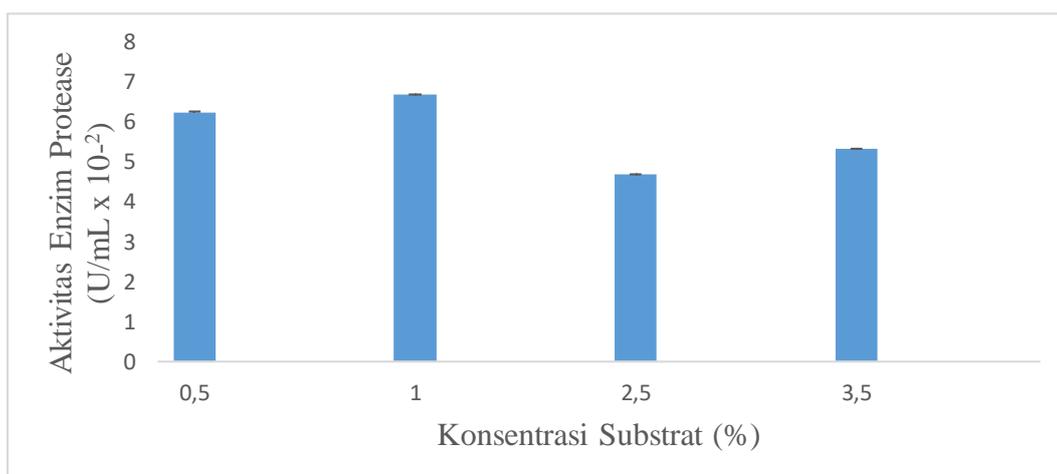
Tabel 4. 3 Aktivitas enzim protease terhadap konsentrasi substrat

Keterangan : huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi $\text{sig} < 0,05$

Pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim protease tertinggi pada konsentrasi substrat 1 % sebesar $6,701 \times 10^{-2}$ U/mL. Setelah mengalami kenaikan aktivitas enzim mengalami penurunan dimulai dari konsentrasi substrat 2,5% -3,5% sebesar 4,685 U/mL dan 5,336 U/mL, kemudian mengalami kenaikan sedikit pada konsentrasi 3,5%,. Kenaikan dan penurunan enzim tersebut dapat disebabkan karena perbandingan jumlah enzim dan substrat tidak sesuai sehingga menyebabkan interaksi antara enzim dengan substrat tidak terjadi dengan baik.

Menurut Fifendi (2017) menjelaskan bahwa ektivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang tersedia. Jika konsentrasi substrat yang digunakan sesuai maka dapat meningkatkan aktivitas enzim, tetapi ketika jumlah konsentrasi substrat yang digunakan terlalu banyak maka dapat mengurangi aktivitas enzim enzim hal ini dikarenakan sisi aktif enzim telah jenuh. Kejenuhan enzim merupakan kondisi enzim dengan sisi aktif yang telah dipenuhi oleh substrat, sehingga menyebabkan aktivitas enzim menurun (Fathimah, dkk, 2014). Grafik aktivitas enzim protease yang dipengaruhi konsentrasi substrat ditunjukkan pada Gambar 4.9

Berdasarkan hasil uji ANOVA One way menunjukkan nilai F hitung sebesar 12,565 lebih besar dari F tabel yaitu 4,46 dengan probabilitas (Sig) sebesar 0,002 (Sig<0,05), hal ini dapat diketahui bahwa konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease memiliki pengaruh secara signifikan. Konsentrasi substrat 2,5% dan 3,5% menunjukkan berbeda nyata, pada konsentrasi substrat 3,5% dengan 0,5% menunjukkan beda nyata, dan konsentrasi substrat 0,5% dengan 1% juga menunjukkan beda nyata sedangkan konsentrasi substrat 1% tidak berbeda nyata dengan konsentrasi substrat lainnya.



Gambar 4. 9 Rata-rata aktivitas enzim protease berbagai konsentrasi substrat

Pada Gambar 4.9 menunjukkan bahwa pengaruh konsentrasi substrat tertinggi pada 1% dan setelah itu mengalami penurunan. Menurut David, dkk (2022) laju reaksi enzimatik meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi sampai tercapai laju yang membatasi, kemudian peningkatan lebih lanjut dalam konsentrasi substrat tidak menghasilkan perubahan yang signifikan. Pada titik ini terdapat begitu banyak substrat sehingga pada dasarnya semua sisi aktif enzim memiliki substrat yang terikat. Sehingga menyebabkan molekul jenuh dengan substrat.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi dan langit tidak ada yang sia-sia, tetapi banyak manfaat yang di dapat oleh manusia. Allah SWT memberikan akal fikiran kepada manusia untuk senantiasa merenung dan berfikir dengan menggunakan akal atas semua yang terjadi. Selain itu dengan akal fikiran kita diharuskan untuk lebih peka terhadap lingkungan dan kejadian yang terjadi di sekitar kita. Seperti dalam firman Allah SWT QS. Ali Imron Ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ۚ ۱۹ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ
 اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا
 سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۚ ۱۹۱

Artinya : “ 190. Sesungguhnya pada kejadian langit dan bumi dan pada pertukaran malam dan siang ada tanda-tanda (kekuasaan, kebijakan dan keluasan rahmat Allah), 191. Yaitu orang-orang yang menyebut dan mengingat Allah semasa mereka berdiri dan duduk dan semasa mereka berbaring dan mereka pula memikirkan tentang kejadian langit dan bumi (sambal berkata): Wahai Tuhan kami Tidaklah Engkau menjadikan benda-benda ini dengan sia-sia, maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari azab neraka”.

Berdasarkan tafsir Al-Misbah dijelaskan bahwa kepemilikan Allah SWT atas alam raya, maka disini Allah menguraikan sebagian dari penciptan-Nya yang

diperintahkan untuk memikirkannya. Karena sesungguhnya dalam penciptaan seperti kejadian benda-benda angkasa seperti matahari, bulan dan jutaan gugus bintang yang terdapat dilangit serta kajadian dan perputaran bumi dan porosnya. Orang yang senantiasa mengingat Allah SWT dengan ucapan ataupun hati dalam segala situasi dan kondisi (bekerja atau beristirahat, berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring), sedangkan tafakur memikirkan ciptaan Allah SWT, yaitu kejadian di alam semesta. Dengan melakukan dua hal tersebut sampailah pada hikmah yang berada di balik proses mengingat dan berfikir yakni mengetahui, memahami, serta menghayati bahwa dibalik fenomena alam dan segala sesuatu yang ada di dalamnya menunjukkan adanya sang pencipta Allah SWT (Sihab, 2002).

Berdasarkan ayat QS. Ali Imron kita sebagai seorang muslim yang berakal hendaknya untuk bertafakur. Salah satunya memikirkan dan meneliti lebih lanjut mengenai bakteri *Weissella confusa* sebagai ciptaan tuhan. Berdasarkan penelitian menunjukkan bahwa bakteri dengna ukuran kecil dan tidak dapat dilihat secara langsung ini memiliki manfaat berupa enzim protease yang dihasilkan. Perlakuan dengan berbagai kondisi dan proses mampu menghasikan enzim yang lain. Hal ini menunjukkan penciptaan bakteri *Weissella confusa* yang mempunyai ukuran sangat kecil memiliki tujuan dan hikmahnya tersendiri.

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa bakteri *Weissella confusa* dapat menghasilkan enzim protease, dimana enzim tersebut dapat dimanfaatkan oleh orang lain. Dengan kita membantu dan mempermudah pekerjaan orang lain, kita akan memperoleh amal soleh. Sehingga apa yang kita lakukan tidak sia-sia. Seperti pada QS Surat An-Nahl ayat 97 yang berbunyi:

مَنْ عَمِلَ صَالِحًا مِّنْ ذَكَرٍ أَوْ أُنْثَىٰ وَهُوَ مُؤْمِنٌ فَلَنُحْيِيَنَّهٗ حَيٰوةً طَيِّبَةً وَلَنَجْزِيَنَّهُمْ أَجْرَهُمْ بِأَحْسَنِ مَا كَانُوا يَعْمَلُونَ

Artinya : “ *Barang siapa yang beramal shalih dari laki-laki dan perempuan, sedang dia adalah beriman, maka akan Kami hidupkan dia dengan kehidupan yang baik, dan akan Kami tunaikan kepada mereka pahala mereka dengan yang lebih bagus dari apa yang pernah mereka kerjakan*”.

Berdasarkan tafsir Al-Misbah siapapun yang mengerjakan amal saleh, apapun jenis kelaminnya, baik laki-laki maupun perempuan, sedang dia adalah mukmin yakni amal yang dilakukannya lahir atas dorongan keimanan yang shahih, maka sesungguhnya pasti akan kami berikan kepadanya masing-masing kehidupan yang baik di dunia ini dan sesungguhnya akan kami berikan balasan kepada mereka semua di dunia dan di akherat dengan pahala yang lebih baik dan berlipat ganda dari apa yang telah mereka kerjakan (Sihab, 2002). Berdasarkan surat An-Nahl ayat 97 menegaskan bahwa balasan atau imbalan bagi mereka yang beramal saleh adalah imbalan dunia dan akhirat.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. pH memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *Weissella confusa*. aktivitas enzim tertinggi sebesar $7,692 \times 10^{-2}$ U/mL terjadi pada pH 8.
2. Konsentrasi substrat juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Weissella confusa* dengan konsentrasi substrat 1% menunjukkan aktivitas tertinggi dari enzim protease dengan nilai sebesar $6,701 \times 10^{-2}$ U/mL.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjut dengan mengkaji faktor lain yang mempengaruhi aktivitas enzim seperti aktivator dan inhibitor (penghambat) untuk mengetahui optimasi aktivitas enzim protease yang dihasilkan bakteri *Weissella confusa*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konsentrasi substrat dengan menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh berbagai substrat seperti azokasein, gelatin dan BSA untuk mengetahui pengaruh substrat dalam menghidrolisis enzim protease.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pH dengan range basa untuk mengetahui pH optimum dalam menghasilkan aktivitas enzim protease tertinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, Arnim, Yetti, M., & Yuherman., 2018. *Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Proteases from Bekasam for use as a Bees Tenderizer*. Vol 17 No 8. Hal 361-367.
- Agustina, D. K. S. Si., M.Pd., Devita S.Si., M.Pd., & Dian P. A, S. Si., M.Pd. 2019. *Bioteknologi Mikrobiologi Tinjauan Umum dan Aplikasi*. Banten: CV.AA.RIZKY.
- Ahmad, M. S., Baraka, A., Abdel, S., Manal, M., Y., & Safaa, S.T. 2018. Optimization and Characterization of Bacterial Proteinase Enzyme Using Whey as a Fermentation Medium. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. Vol 8 No 2.
- Baehaki, A. 2019. *Exploration of Protease Enzyme Producing Bacteria From Water in Tanjung Senai Aswamp Indralaya South Sumatra*. Prosiding Seminar Nasional Seminar Nasional Lahan Suboptimal.
- Baehaki, A., Maggy, T., Suhartono., Nurheni, S. P., & Tati, N. 2008. Purification dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Tekno dan Industri Pangan*. Vol.19, No.1. Hal : 80-86.
- Baehaki, A., Rinto & Arief, B. 2011. Isolasi Dan Karakterisasi Protease Dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *J. Teknol. Dan Industri Pangan*. Vol. XXII, No.1. Hal: 40-45.
- Baltaci, M. O., Genc .B., Arslan .S., Adiguzel .G., Adiguzel .A. 2017. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnologically important enzyme production. *Geomicrob J* .Vol 34 No.1. Hal: 53-62.
- Benimana, F. 2020. Protease Activity In Flesh Leaves Of *Bidens Pilosa*. *International Journal Of Scientific & Technology Research*. Vol 9. Issue 3. Hal 3018-3112.
- Bunch, T & Michaela, R. 2019. *Bacterial Growth Curve by OD₆₀₀ and SoloVPE*. Biofactory Competence center.
- Chalim, M. A. 2021. Karakterisasi Eksopolisakarida Yang Dihasilkan Oleh *Weissella confusa* Dan Potensinya Sebagai Antibakteri Terhadap *Salmonella typhi*. SKRIPSI. Fkultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual*. California: The Benjamin Comings Publishing Company.Inc.

- Choi, G. H., Lee, N. K., & Paik, H. D. 2021. Optomization of Medium Composition for Biomass Production of *Lactobacillus plantarum* 200655 Using Response Surface Methodology. *J. Microbiol. Biotechnol.* Vol 31. No 5. Hal : 717-725.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., & Wallbanks, S. 1993. Taxonomic Studies On Some *Leuconotoc*-Like Organism From Fermented Sausages: Description Of a New Genus *Weissella* For The *Leuconostoc* Paramesenteroids Group Of Species. *Journal Of Applied Bacteriology.* Vol.75, No.6. Hal: 595-603.
- Dash, S. G. 2017. Microbial Characterization and Optimized of Protease Producing by Bacillus SP.Isolated from Soil. *International Journal of Innovations in Engineeringand Technology (IJIET).* Vol. 8. No 1.
- Daisy. 2012. *Autoklaf.* Kanisius : Bandung.
- Darsan, H., Said, I. Z., & Rachmad, I. 2019. Program Pembuatan Alat Autoclave Untuk Sterilisasi Kemasan Kaleng Pada Kelompok Usaha Bellia Indah Untuk Produk Ikan Kemamah di Kecamatan Ulee Kareng Kota Banda Aceh. *Proceeding Seminar Nasional Politeknik Negeri Lohoksumawe.* Vol.3 N. 1. Hal : 70-73.
- David, W., John, W. H., & Rhonda, J. 2022. *The Basic Of Gob Chemistry.* California: Multimedia Educational Resource for Learning and Online Teaching.
- Di, C. R., Coda, R., De .A. .M., & Gobbetti .M. (2013). Exploitation of Vegetables and Fruits Through Lactic acid Fermentation Food. *Microbiology.* Vol 33. No 2. Hal :1-10.
- Elsair, R. 2012. *Fundamentals of Chemistry.* Denmark : Ventus Publishing Aps.
- Everette, J. D., Quinton, M. B., Ashlee, M. G., Yvonne, A. A., Grant, W. W., & Richard, B. W. 2010. A thorough Study Of Reactivity Of Various Compound Classes Towards The Folin Ciocalteu Reagent. *J Agric Food Chem.* Vol 58, No.14. Hal: 8139-8144
- Fathimah, S., Nora, I., Adhitiyawarman, & Lucy, A. 2014. Penentuan Kinetika Hidrolisis Enzimatis Dalam Pembuatan Bioetanol Dari Tandan Kosong Kelapa Sawit. *JKK.* Vol. 3, No.4. Hal : 46-51.
- Fessard, A dan Remzie, F. 2017. Why Are *Weissella spp.* Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation. *Fermentation.* Vol. 3 No.38.
- Fusco, V., Quero, M., & Grazia. 2015. The Genus *Weissella*: Taxonomy, Ecology and Biotechnological Potential. *Frontiers in Microbiology.* Vol 6.

- Fusco, V., Grazia, M., Quero, Gaetano, S., Maria, M., & Angelo, V. 2011. Novel PCR-based Identification Of *Weissella confusa* Using an AFLP-derived. *International Journal of Food Microbiology*. Vol.145, No. 2-3. Hal 437-443.
- Francois, N. 2014. Concomitant Production Of Detergent Compatible Enzyme by *Bacillus flexus* XJU-1. *Braz.J.Microbial*. Vol.45. No.3. Hal:213-215.
- Festus, F. I., Duyilemi, O. P., & Onilude, A. A. 2018. Production Characteristics and Molecular Properties of Protease of *Pediococcus acidilactici* Isolated from Beef Under Cold Storage. *Microbiology Research Journal International*. Vol.24, No.4. Hal: 1-14.
- Goh, H. F & Koshy, P. 2015. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin. *Research Artikel*. Vol. 10. No.10. Hal: 1-17.
- Ghozali, I. 2016. *Aplikasi Analisis Multivariete Dengan Program IBM SPSS 23*, Edisi 8. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Handayani, R., Sulistiani, & Ninu, S. 2016. Identifikasi Produksi GABA Dari Kultur Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan metode TLC. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. Vol. 2, No.2. Hal : 208-213.
- Harsujuwono, B. A., Arnata, W. I., & Gusti, A. K. D. P. 2011. *Rancangan Percobaan Teori, Aplikasi SPSS dan Excel*. Malang: Lintas Kata Publishing.
- Haslaniza, H. M. Y., Maskat, W. M., Wan, A. S., & Mamot. 2010. The Effects of Enzyme Concentration, Temperature, and Incubation Time on Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipitate from Cockle (*Anadara granosa*) Meat Wash Water. *Int. Food Res J*. Vol. 17, No. 147152.
- Ismail. Y.S., Yulsivar., C., & Mazhitov. B. 2018. *Characterization Of Lactic Acid Bacteria From Local Cow's Milk Kefir*. IOP Conf.Series: Earth and Environmental Science 130.
- Jin, T .S. 2016. *Isolation And Characterization of Enzyme Protease From Pumpkin And It's Affinity to Different Protein Substrate*. Bachelor of Science (HONS) Chemistry. University Tunku Abdul Rahman.
- Karthikeyan, Gnanasekeran., & Annamalai, P. 2018. Milk Clotting And Proteolytic Activity Of Protease Enzyme From *Lactobacillus delbrueckii* Isolated From Raw Goat Milk. *Australian Journal of Pharmaceutical Biology*. Vol 1, No.1.
- Khaldun, Ibnu. 2018. *Kimia Analisa Instrumen*. Banda Aceh: Syiah Kuala University Press.

- Khusnati, T., Nanda, S. 2019. Characterization of Protease Crude Extract from Indigenous Lactic Acid Bacteria and the Protein Degradation Capacity in Local Tuber and Cereal Paste Flour. *J.Kim. Terap. Indonesia*. Vol. 21. No.1
- Kant, K. 2016. Partial Purification and Characterizataion of Alkaline Protease From Halophilic Bacteria *Bacillus sp.* *International Journal of Current Research*. Vol.8. No.11.
- Kang, B. K., Cho, D. S. 2016. *Red Pepper Powder is a Crucial Factor That Influences The Ontogeny Of Weissella cibaria During Kimchi Fermentation*. *Scientific Reports*. No.6, Vol 28232. Hal:1-8
- Kim, S. W. 2013. In Vitro Bacterial Effects of 625, 525, and 425 nm Wavelength (Red, Green, and Blue) Light-Emitting Diode Irradiation. *Photomed Laser Surg*. Vol.31. No.11. Hal: 554-562.
- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. Thenawidjaja M, penerjemah. Jakarta: Principle of Biochemistry.
- Liu, X., Hongye, Q., Mengxing. G., Hongyue. G., Liyan. W., & Xiaohui. Y. 2020. Application of *Weissella cibaria* X31 Or *Weissella confusa* L2 As A Starter in Low Nitrite Dry-Fermented Sausages. *Int. J. Food Eng*. Vo.16, No.8. Hal: 1-12.
- Mayers, J. A., Brandon, S., & Wayne, R. C. 2013. Improving Accuracy Of Cell And Chromophore Concentration Measurements Using Optical Density. *BMC Biophysic*. Vol. 6, No.4. Hal : 1-15.
- Marnolia, A., Yuli, H., & Fifi, P. 2016. Uji Aktivitas Enzim Protease Dari Isolat *Bacillus sp* Endofit Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis quinensis*). *Jurnal Photon*. Vol6, No.2. Hal : 1-5
- Moran, L.A. 1994. *Biochemsitry Second Ed. Prentice Hall, Inc.* Upper Saddle River.
- Mahulette. F., Nisa. R. M., Antonius. S., & Widanarni. 2016. Isolatio And Characterization Of Latic Acid Bacteria From Inasua. *Journal of Tropicaal Biodiversity and Biotechnology*. Vol. 1, No.2. Hal: 71-76.
- Meganada, H. M,Kes., Sukini, S.SiT, MH.Kes & Yadong, S.St, MH.Kes. 2017. *Mikrobiologi*. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Muwarni, S. 2015. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Veteriner*. Malang: UB Press.
- Wijayanti, N., Christina, A., & Suci, M. 2014. Transformasi α -Pinena Dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Journal of Biology & Biology Education*. Vol. 6, No.1. Hal : 25-28.

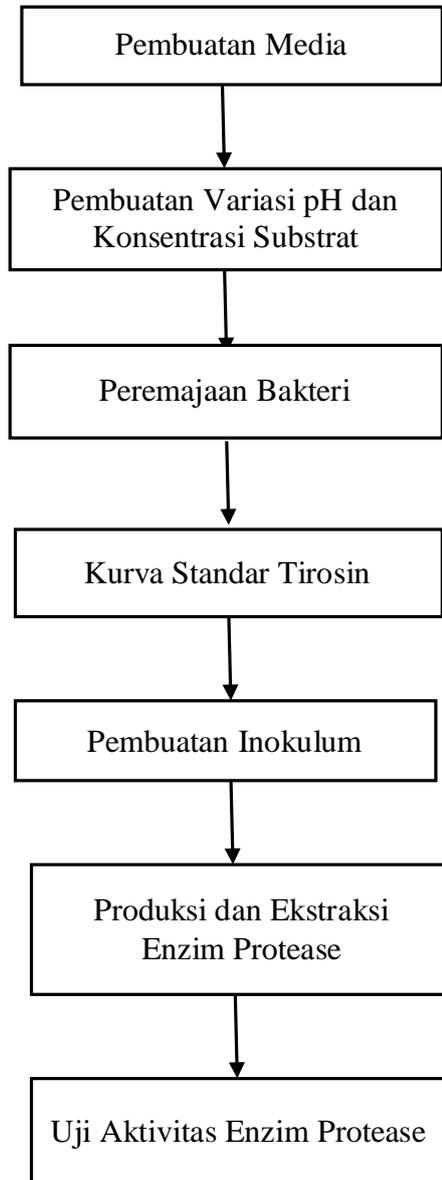
- Nizar, I. H. 2015. Analisis Potensi Protease Ekstraseluler Tanah Hutan Mangrove Pantai Suung Kauh Bali. *Cakra Kimia Indonesia E-Journal of Applied Chemistry*. Vol.3 No.2.
- Onilude, A. A & Oke, M.A. 2014. Partial Purification and Characterization of Extracellular Protease from *Pedicoccus acidilactici*. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*. Vol.22. No.1&2. Hal: 19-25.
- Cushia, M., Craig, S., Ayomikun, E., Julia, R., Simon, S., & Frederique, V. 2021. *Optical Methods Fo Bacterial Detection And Characterization*. *APL Photon*. 6, 080903.
- Olubusola, A., Odeniyi, & Ometere, S. 2018. Assessment of Proteolytic and Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria from Protein-Based Fermented Foods Sourced from Local Markets in Ibadan. *Advanced Science Letters*. Vol 24, No.5. Hal 3678-3583.
- Palmer, T. 1995. *Understanding Enzyme. Fourth Edition*. Now York: Ellishorwood.
- Perwendha, P., Oetari, A., & Sjamsuridzal, W . 2020. *Skimme milk-degradaing ability of Rhizopus azygosporus UICC 539at Various Temperatures*. *AIP Conference Proceedings* 2242.
- Punekar, N.S. 2018. *Enzymes : Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Indian : Institute of Tecnologu Bombay.
- Quttrini, M., Korcari, D., & Ricci, G. 2019. A Polyphasic Approach to Characterization *Weissella cibira* and *Weissella confusa* Strain. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 2, No.2. Hal : 1-13.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Rachman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi*. Bogor : IPB.
- Rajalingan, D., Loftis, C., Jiashou, J. X., & Thallapuram, K. S. K. 2009. Theicholoacetic Acid –Induced Protein Precipitation Involves The Reversible Association of a Stable Partially Structured Intermediate. *Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arkansas*. Vol. 18. Hal: 980-993.
- Rahmi, H., Hariyanti, Rina, P. A., & Devi, W. 2020. Analisis Hasil Fraksinasi Protease dan Lipase Yang Berasal Dari Saluran Pencernaan Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal BIOTEKNOLOGI & BIOSAINS INDONESIA*. Vol. 7, No.2. Hal : 194-202.

- Rini, S. C & Rohmah, J. 2020. *Buku Ajar Bakteriologi Dasar*. Sidoarjo: UMSIDA Press.
- Rodarte, M. P., Dias, D. R., Vilela, D. M. & Schwa, R. F., 2011. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy Maringá*,. Vol.33. No.3 Hal: 457-464.
- Shihab, M. Q. 2002. Tafsir Al Misbah : Pesan, Kesan dan Keserasaian Al-Qur'an. Jakarta : Lentera Jelita.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Spektroskopi*. Yogyakarta : Liberty.
- Sarjono, P. R., Ismayarto, Ngadiwiyana, & Nor, B. A. P. 2022. Bakteri Endofit F4 dari Daun Pepaya (*Carica Papaya* L): Potensinya sebagai Penghasil Enzim Ekstraseluler. *J. Environ. Chem*. Vol. 2, No.1. Hal: 1-7.
- Sade, E., Lassila, E., & Bjorkhroth, J. (2016). *Lactic acid Bacteria in Dried Vegetables and Spicies Food*. Microbiology. Vol.53. No.3. Hal:110-114.
- Sharma, N. 2013. Kinetic of free and immobilized protease from *Aspergillus* sp. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Vol. 7. No. 2.
- Shukla, S. 2011. 16S Rrna-Based Identification of a Glucan-Hyperproducing *Weissella Confusa*. *Research Artikel*. Vol. 34. No.5. Hal: 237-236.
- Simamora, C. J. K., dan Sukmawati, S. 2020. Identifacation and Characterization of PrTK-2 Bacterial Isolat Producing Extracellular Protease Enzyme from Rubber Seeds Tempeh. *Bioscience*. Vo. 4, No.1. Hal: 79-88.
- Sumardi, Salman, F., Christina, N. E., & Milsa, S. D. 2019. Ativitas dan Karakterisasi Enzim Protease Isolat *Bacillus sp* (UJ132) Secara Kualitatif dan Kuantitatif. *Jurnal Riset Akuakultur*. Vol. 14, No.3. Hal : 193-199.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometer UV-Vis dan Spektrofotometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organi*. Lampung : AURA.
- Sulthoniyah, S. T., Harodoko, M., & Happy. N. 2015. Characterization of Extracellular Protease Lactic Acid Bacteria From Shrimp Paste. *J.Life Sci. Biomed*. Vol.5. No.1. Hal: 01-05.
- Shaefer. 1969. *Sporulation and the Production of Antibiotics, Exoenzyme, dan Exotoxins*. Bacteriol. Rev. 33: 48-71.
- Tanasupawat. S., Phoottosavako. M., & Keeratipibul. S. (2015). Characterization and Lipolytic Activitiy of Lactid Acid Bacterial Isolated From Thai Fermented Meat. *J Appl Pharm SCI*. Vol.5. No 64. Hal:006-012.

- Wardani, A. K., & Lia, O. N. 2012. Purifikasi Dan Karakterisasi Protease Dari Bakteri Hasil Isolasi Dari Whey Tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol. 13, No.3. Hal : 149-156.
- Yousef, A. E & Clastrom. C. 2003. *Food Microbiology (A Laboratory Manual)*. Wiley-Intersection, John Wiley and Sons, Inc. Ohiosate University. USA. Hal: 223-224.
- Yoga, K. W. 2015. Penentuan Konsentrasi Optimum Kurva Standar Antioksidan: Asam Galat, Asam Askorbat dan Trolox terhadap Radikal Bebas DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 Mm. Proceeding Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA V.
- Yusriah dan Dwianita, K. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium sp.* JURNAL SAINS DAN SENI POMITS. Vol.2, No.1. Hal: 2337-3520.

LAMPIRAN

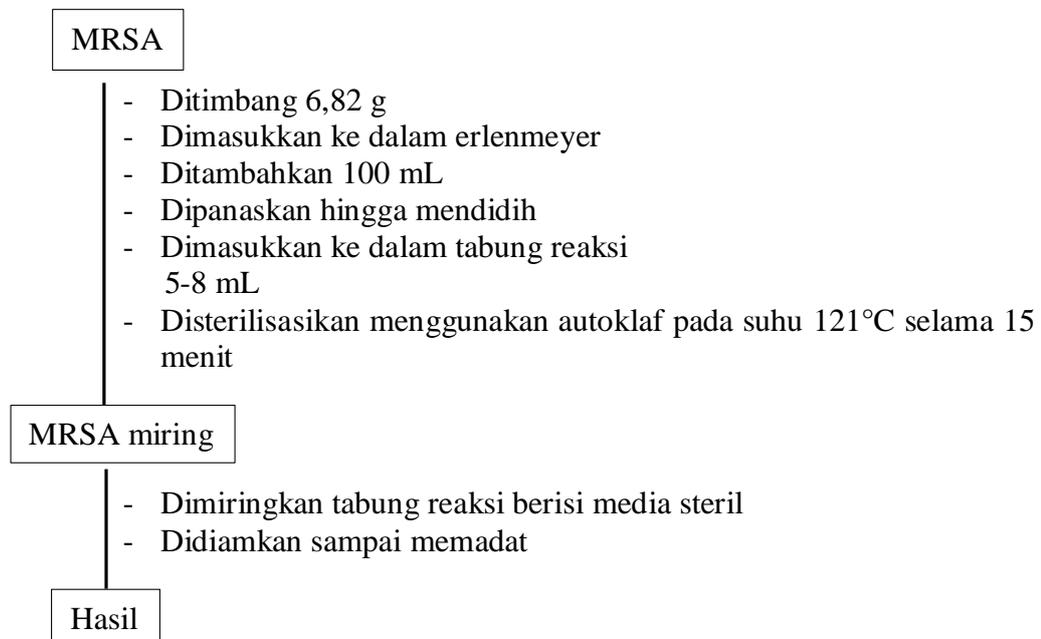
Lampiran 1. Rancangan penelitian



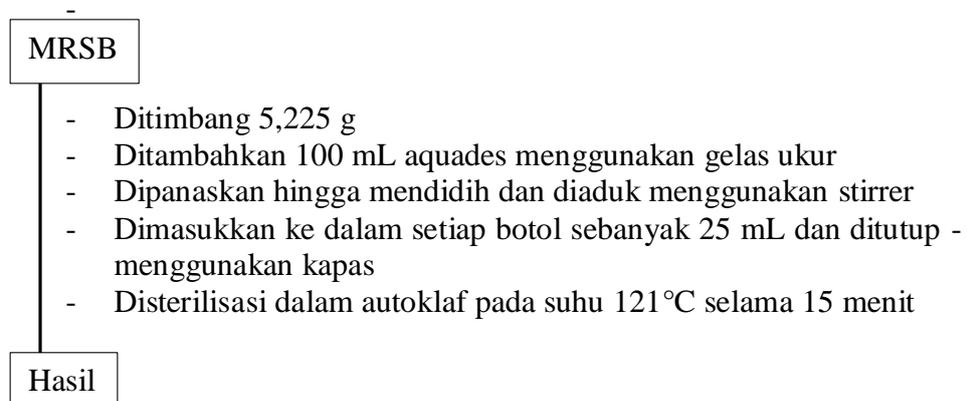
Lampiran 2. Lampiran Kerja

2.1 Pembuatan Media

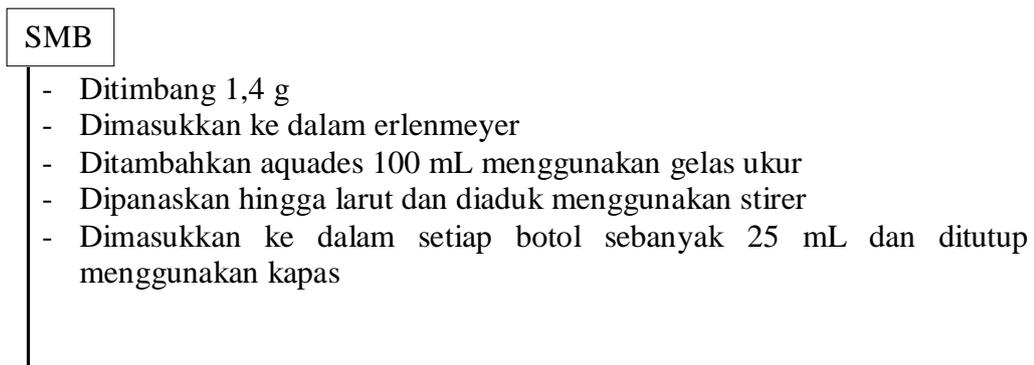
2.1.1 *Media De Man Sa Agarosa (MRSA) (Dash, 2017)*



2.1.2 *Media Ron Sa Broth (MRSB) (Dash, 2017)*



2.1.3 *Skim Milk Broth (SMB)*



- Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

Hasil

2.2 Regenerasi *Weissella confusa*

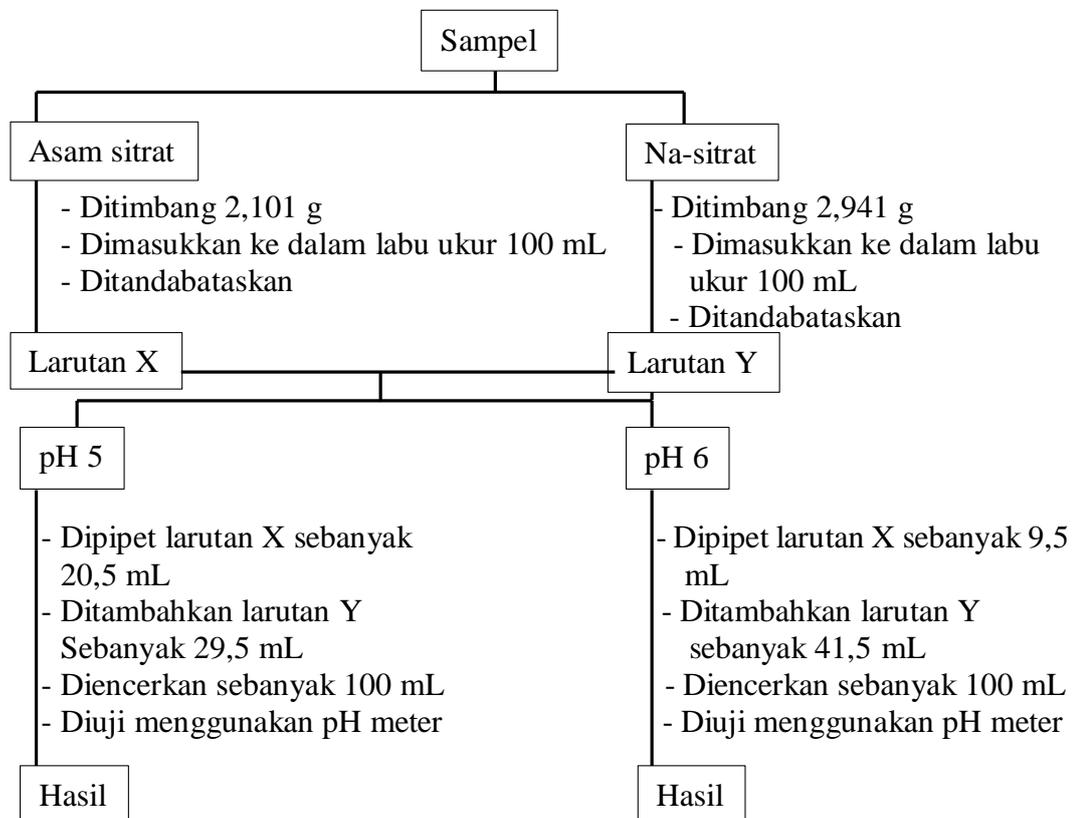
Weissella confusa

- Diambil isolat *Weissella confusa* menggunakan jarum ose
- Digoreskan ke dalam media MRSA miring
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam

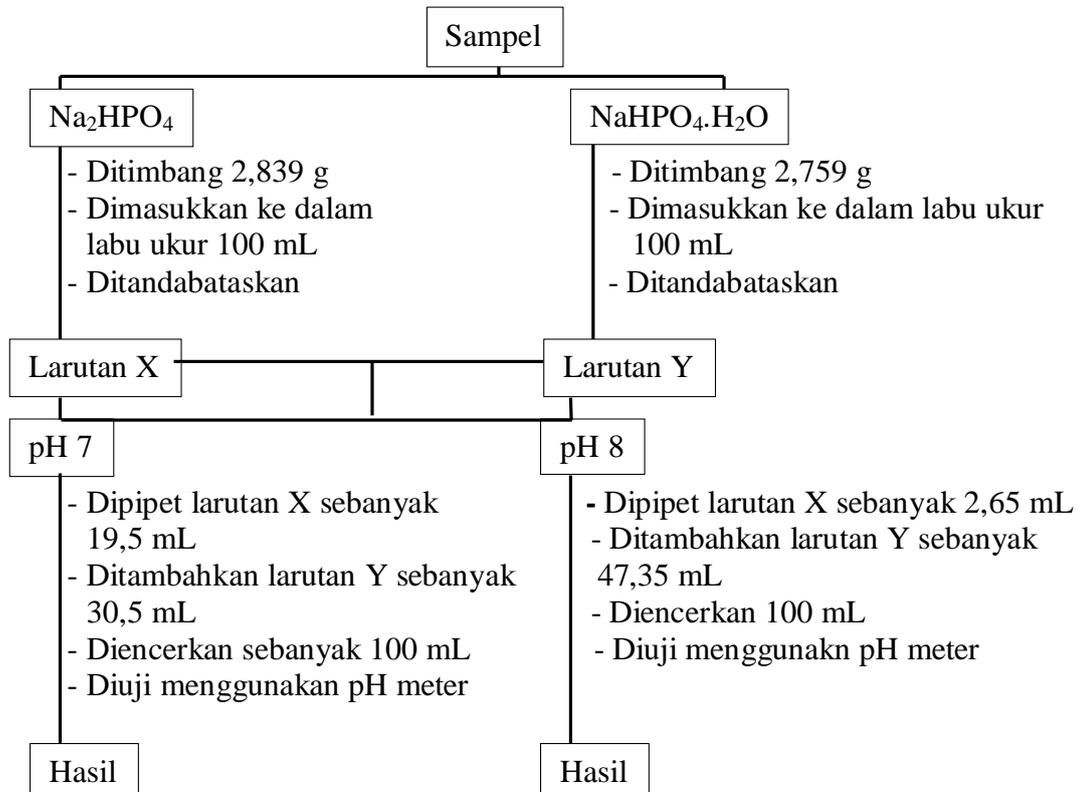
Hasil

2.3 Pembuatan Buffer

2.3.1 Buffer 5 dan 6

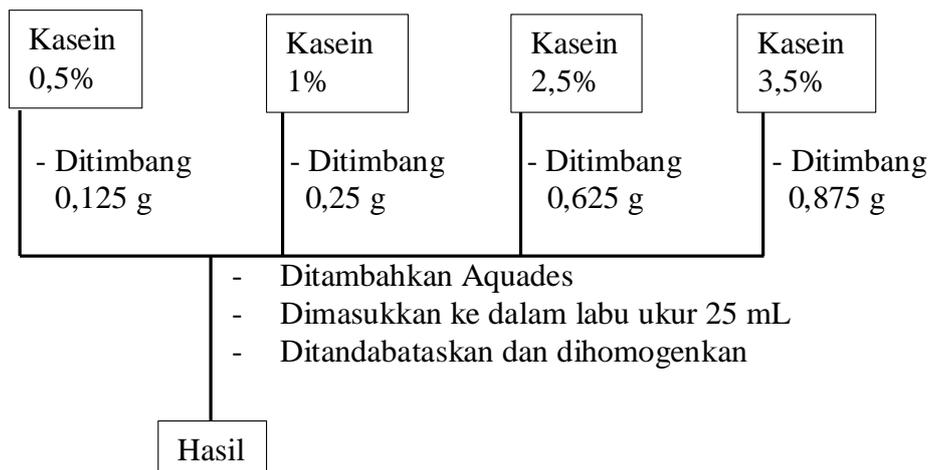


2.3.2 Buffer 7 dan 8



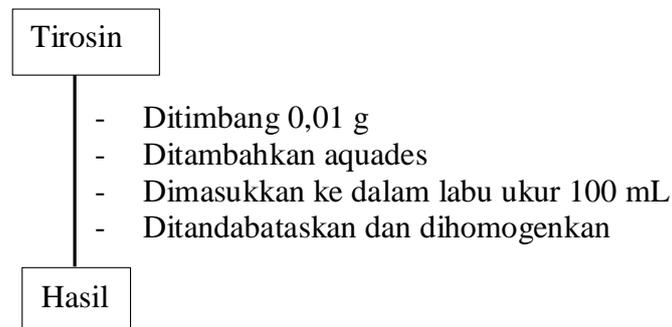
2.4 Pembuatan Substrat

2.4.1 Substrat Variasi 0,5%, 1%, 2,5% dan 3,5%

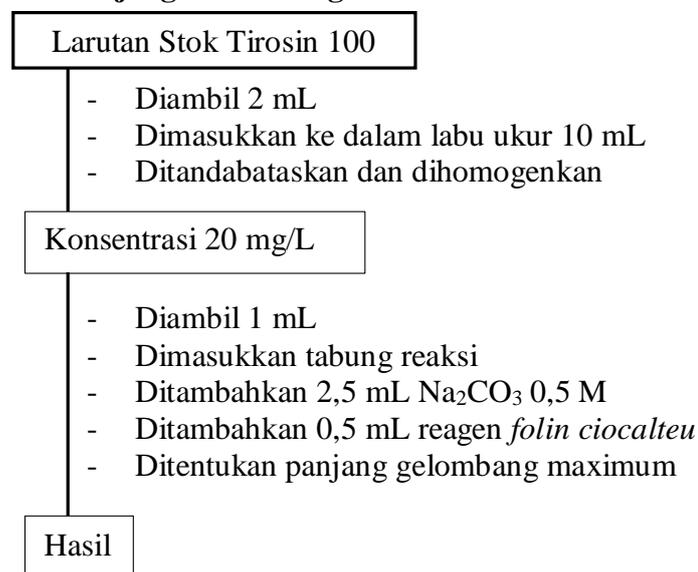


2.5 Kurva Standar Tirosin

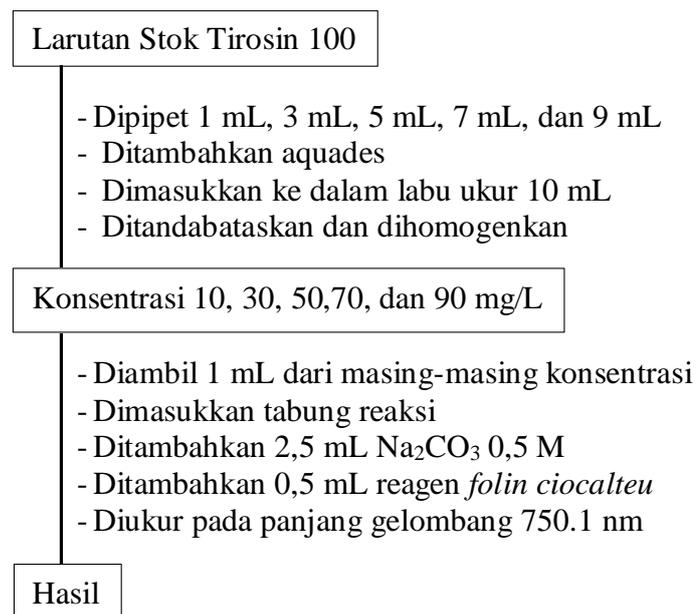
2.5.1 Pembuatan Larutan Stok 100 mg/L (ppm)



2.5.2 Penentuan Panjang Gelombang

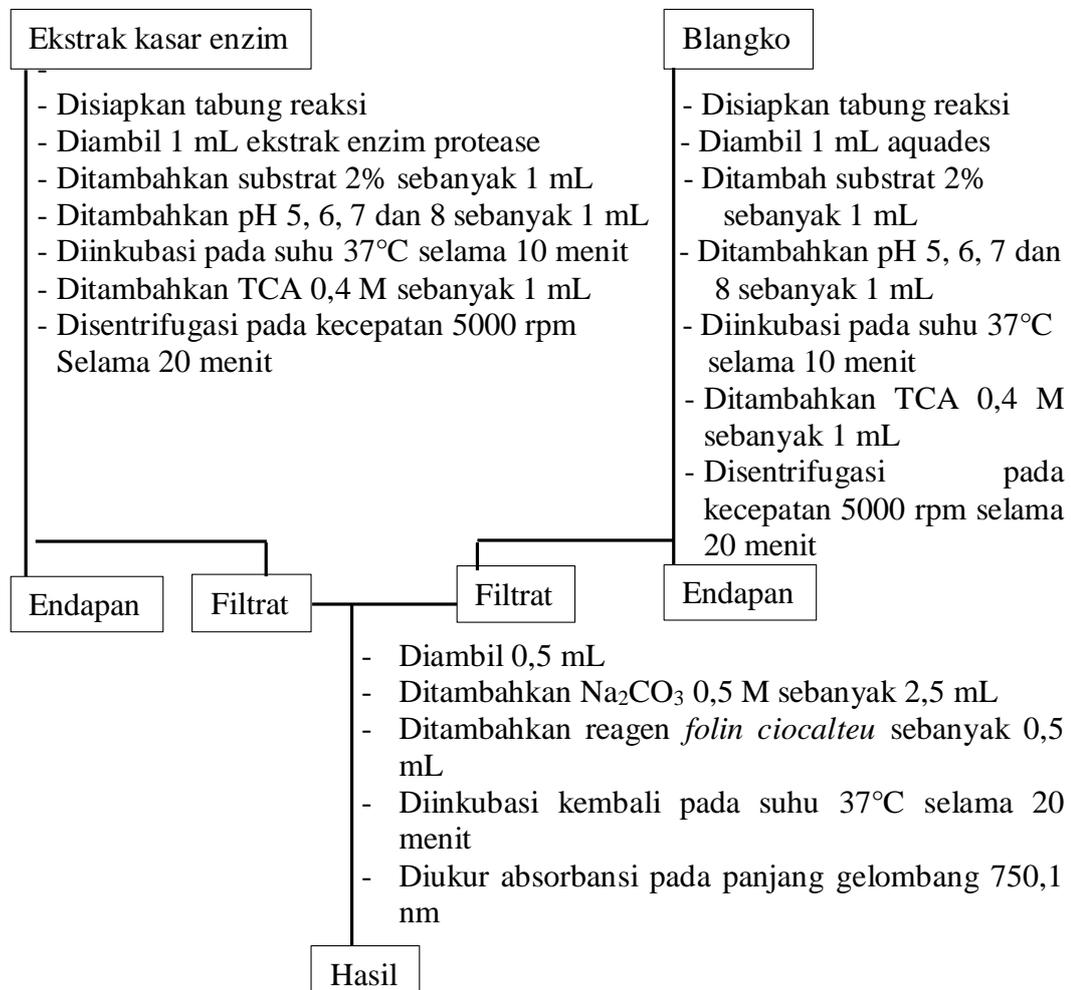


2.5.3 Pengukuran Kurva Standar Tirosin

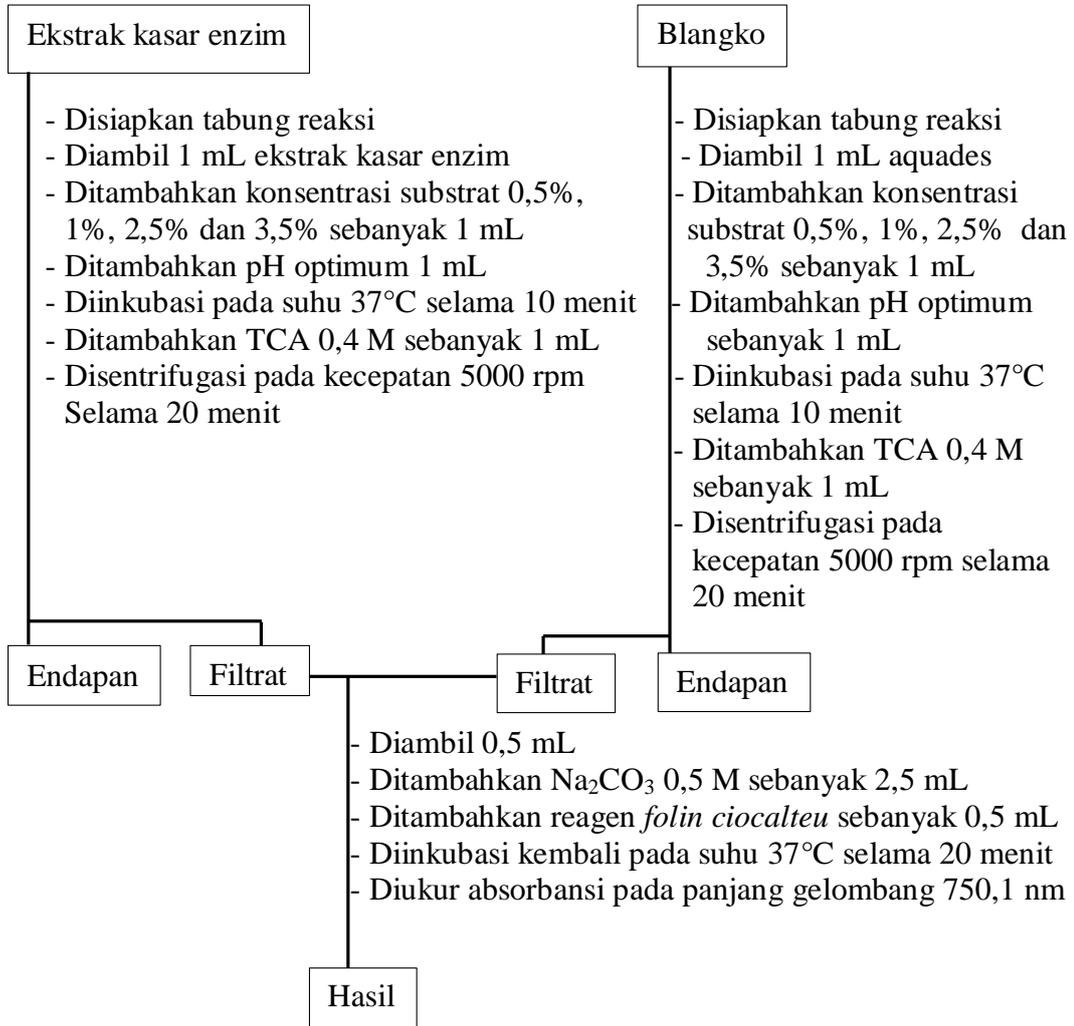


2.7 Karakterisasi Enzim Protease

2.7.1 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Protease (Afriani, 2018)



2.7.2 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Enzim Protease



Lampiran 3 Perhitungan

3.1 Pembuatan Larutan Standart Tirosin

3.1.1 Larutan stok tirosin 100 mg/mL

$$0,01 \text{ g/mL} = \frac{0,01 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = 0,1 \text{ mg/mL}$$

$$\frac{0,1 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 0,01 \text{ mg/mL}$$

Cara pembuatan :

Tirosin ditimbang sebanyak 0,01 g kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. larutan ditandabatkan dengan aquades dan dihomogenkan.

3.1.2 Penentuan konsentrasi kurva standar

Konsentrasi 10 mg/mL

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

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

$$M_2 = \frac{100}{10} = 10 \text{ mg/mL}$$

Cara pembuatan :

Larutan stok tirosin 100 ppm diambil sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Larutan ditandabatkan menggunakan aquades dan dihomogenkan. Langkah diulangi untuk membuatn larutan standar dengan konsentrasi 30, 50, 70, dan 90.

Tabel 3.2.1 Konsentrasi Kurva Standar

Volume Tirosin (mL)	Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
1	10	0,0990
3	30	0,2637
5	50	0,4289
7	70	0,5803
9	90	0,7130

3.1.3 Pembuatan Larutan Na₂CO₃ 0,5 M

$$M = \frac{\text{mol}}{V}$$

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

$$\text{Mol} = 0,05$$

$$\text{Massa} = \text{Mr} \times \text{mol}$$

$$= 105,99 \times 0,05$$

$$= 5,3 \text{ g}$$

Cara pembuatan :

Na₂CO₃ ditimbang sebanyak 5,3 g kemudian dilarutkan menggunakan aquades.

Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan dihomogenkan.

3.1.4 Pembuatan Larutan TCA 0,4 M

$$M = \frac{\text{mol}}{V}$$

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

$$\text{Mol} = 0,04$$

$$\text{Massa} = \text{Mr} \times \text{mol}$$

$$= 163,4 \times 0,04$$

$$= 6,54 \text{ g}$$

Cara pembuatan :

TCA ditimbang sebanyak 6,54 g kemudian dilarutkan menggunakan aquades.

Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan dihomogenkan.

3.1.5 Pembuatan pH

3.1.5.1 Buffer fosfat

$$g = \text{mol} \times \text{Mr}$$

$$\begin{aligned} \text{Larutan A (Na}_2\text{HPO}_4) : \text{mol} &= M \times V \\ &= 0,2 \times 0,1 \\ &= 0,02 \\ g &= \text{mol} \times \text{Mr} \\ &= 0,02 \times 141,96 \\ &= 2,839 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Larutan B (NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O)} : \text{mol} &= M \times V \\ &= 0,2 \times 0,1 \\ &= 0,02 \\ g &= \text{mol} \times \text{Mr} \\ &= 0,02 \times 137,99 \\ &= 2,759 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\text{Dalam 1000 mL} = \frac{1000}{10} = 100 \text{ mL}$$

$$\text{Larutan A : } 0,2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4 = \frac{2,839}{10} = 0,2839 \text{ g}$$

$$\text{Larutan B : } 0,2 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = \frac{2,759}{10} = 0,2759 \text{ g}$$

X mL larutan A + Y mL larutan B, diencerkan sampai 100 mL

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$\text{pH 7 : } X = \frac{39,0}{2} = 19,5$$

$$Y = \frac{61,0}{2} = 30,5$$

$$X : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,2 \cdot 19,5 = M_2 \cdot 100$$

$$M_2 = 0,0877$$

$$Y : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,2 \cdot 30,5 = M_2 \cdot 100$$

$$M_2 = 0,0123$$

$$\text{pH 8 : } X = \frac{5,3}{2} = 2,65$$

$$Y = \frac{94,7}{2} = 47,35$$

$$X : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,2 \cdot 2,65 = M_2 \cdot 100$$

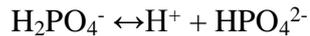
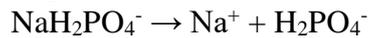
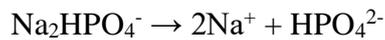
$$M_2 = 0,0053$$

$$Y : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,2 \cdot 47,35 = M_2 \cdot 100$$

$$M_2 = 0,0947$$

Reaksi Pembuatannya :



3.1.5.2 Buffer Sitrat

$$\text{Larutan A (asam sitrat) : mol} = M \times V$$

$$= 0,1 \times 0,1$$

$$= 0,01$$

$$g = \text{mol} \times \text{Mr}$$

$$= 0,01 \times 210,14$$

$$= 2,101 \text{ g}$$

$$\text{Larutan B (Na-sitrat) : mol} = M \times V$$

$$= 0,1 \times 0,1$$

$$= 0,01$$

$$g = \text{mol} \times \text{Mr}$$

$$= 0,01 \times 294,10$$

$$= 2,941 \text{ g}$$

$$\text{Dalam } 1000 \text{ mL} = \frac{1000}{10} = 100 \text{ mL}$$

$$\text{Larutan A : } 0,1 \text{ M asam sitrat} = \frac{21,01}{10} = 2,101 \text{ g}$$

$$\text{Larutan B : } 0,1 \text{ M Na-sitrat} = \frac{29,41}{10} = 2,941 \text{ g}$$

X mL larutan A +y mL larutan B, diencerkan sampai 100 mL

$$\text{pH } 5 : X = 20,5$$

$$Y = 29,5$$

$$X : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,1 \cdot 20,5 = M_2 \cdot 100$$

$$M_2 = 0,0205$$

$$Y : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,1 \cdot 29,5 = M_2 \cdot 100$$

$$M_2 = 0,0295$$

$$\text{pH } 6 : X = 9,5$$

$$Y = 41,5$$

$$X : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,1 \cdot 9,5 = M_2 \cdot 100$$

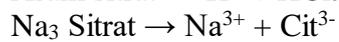
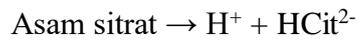
$$M_2 = 0,0095$$

$$Y : M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,1 \cdot 41,5 = M_2 \cdot 100$$

$$M_2 = 0,0415$$

Reaksi Pembuatan :



3.1.6 Pembuatan Inokulum

$$\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 2,0897$$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$2,0897 \cdot V_1 = 0,5 \cdot 25 \text{ mL}$$

$$2,0897 \cdot V_1 = 12,5$$

$$V_1 = 5,98 \text{ mL} \longrightarrow \text{Inokulum}$$

$$V_2 - V_1 = 19,02 \text{ mL} \longrightarrow \text{MRSB}$$

3.1.7 Pembuatan Konsentrasi Substrat

$$\% \frac{W}{V} = \frac{\text{massa zat terlarut (gr)}}{\text{volume larutan (mL)}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} 0,5\% &= \frac{g}{25 \text{ mL}} \times 100 \\ &= 0,125g \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1\% &= \frac{g}{25 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 0,25 g \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2,5\% &= \frac{g}{25 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 0,625 g \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3,5\% &= \frac{g}{25 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 0,875 g \end{aligned}$$

Lampiran 4 Hasil

4.1 Kurva Standar

$$Y = 0,0772x + 0,0308$$

$$R^2 = 0,998$$

4.2 Uji Aktivitas Enzim Protease

Tabel 4.2.1 Absorbansi Uji aktivitas Enzim Pengaruh pH

pH	Ulangan	Absorbansi (nm)
5	I	0,1909
	II	0,2156
	III	0,1883
6	I	0,1633
	II	0,1880
	III	0,1776
7	I	0,1843
	II	0,1970
	III	0,1931
8	I	0,2036
	II	0,2144
	III	0,1834

○ **Konsentrasi**

$$X = \frac{Y - 0,0308}{0,0772}$$

$$\begin{aligned} \text{pH 5: ulangan I} \\ &= \frac{0,1909 - 0,0308}{0,0772} \\ &= \frac{0,1601}{0,0772} \\ &= 2,074 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ulangan II} \\ &= \frac{0,2156 - 0,0308}{0,0772} \\ &= \frac{0,2848}{0,0772} \end{aligned}$$

$$= 2,394$$

$$\begin{aligned} & \text{Ulangan III} \\ &= \frac{0,1883 - 0,0308}{0,0772} \\ &= \frac{0,1575}{0,0772} \\ &= 2,040 \end{aligned}$$

○ **Aktivitas Enzim**

$$AE = \frac{[\text{Tirosin}] \times V}{(P \times q) \times Fp}$$

$$\begin{aligned} & \text{pH 5 : Ulangan I} \\ &= \frac{2,074 \times 3,5}{(0,5 \times 20) \times 10} \\ &= \frac{7,258}{100} \\ &= 0,07258 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Ulangan II} \\ &= \frac{2,394 \times 3,5}{(0,5 \times 20) \times 10} \\ &= \frac{8,378}{100} \\ &= 0,08378 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Ulangan III} \\ &= \frac{2,040 \times 3,5}{(0,5 \times 20) \times 10} \\ &= \frac{7,141}{100} \\ &= 0,07141 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Tabel 4.2.2 Pengaruh Aktivitas Enzim Protease terhadap pH

pH	Ulangan	Konsentrasi Asam amino (mg/L)	AE (U/mL) x 10 ⁻²	Jumlah aktivitas (U/mL)	Rata-rata (U/mL) x 10 ⁻²
5	I	2,074	7,258	0,227	7,592
	II	2,394	8,378		
	III	2,040	7,141		
6	I	1,716	6,007	0,198	6,597
	II	2,036	7,127		
	III	1,902	6,655		
7	I	1,988	6,959	0,219	7,284
	II	2,154	7,535		
	III	2,102	7,358		
8	I	2,238	7,834	0,231	7,692
	II	2,378	8,324		
	III	1,976	6,918		

Tabel 4.2.3 Absorbsni Aktivitas Enzim Pengaruh Konsentrasi Substrat

Konsentrasi Substrat (%)	Ulangan	Absorbansi (nm)
0,5	I	0,1707
	II	0,1634
	III	0,1721
1	I	0,1782
	II	0,1746
	III	0,1830
2,5	I	0,1419
	II	0,1433
	III	0,1172
3,5	I	0,1426
	II	0,1517
	III	0,1512

○ **Konsentrasi**

$$X = \frac{Y - 0,0308}{0,0772}$$

Konsentrasi Subtrat 0,5% : Ulangan I

$$\begin{aligned}
 &= \frac{0,1707 - 0,0308}{0,0772} \\
 &= \frac{0,1399}{0,0772} \\
 &= 1,812
 \end{aligned}$$

Ulangan II

$$\begin{aligned}
 &= \frac{0,1634 - 0,0308}{0,0772} \\
 &= \frac{0,1326}{0,0772} \\
 &= 1,718
 \end{aligned}$$

Ulangan III

$$\begin{aligned}
 &= \frac{0,1721 - 0,0308}{0,0772} \\
 &= \frac{0,1413}{0,0772} \\
 &= 1,830
 \end{aligned}$$

○ **Aktivitas Enzim**

$$AE = \frac{[\text{Tirosin}] \times V}{(P \times q) \times Fp}$$

Konsentrasi substrat 0,5% : Ulangan I

$$\begin{aligned} &= \frac{1,812 \times 3,5}{(0,5 \times 20) \times 10} \\ &= \frac{6,343}{100} \\ &= 0,06343 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Ulangan II

$$\begin{aligned} &= \frac{1,718 \times 3,5}{(0,5 \times 20) \times 10} \\ &= \frac{6,012}{100} \\ &= 0,06012 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Ulangan III

$$\begin{aligned} &= \frac{1,830 \times 3,5}{(0,5 \times 20) \times 10} \\ &= \frac{6,406}{100} \\ &= 0,06406 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Tabel 4.2.4 Pengaruh Akrivitas Enzim Terhadap Konsentrasi Substrat

Konsentrasi Substrat (%)	Ulangan	Konsentrasi Asam amino (mg/L)	AE (U/mL) x 10 ⁻²	Jumlah Aktivitas (U/mL)	Rata-Rata (U/mL) x 10 ⁻²
0,5	I	1,812	6,343	0,188	6,253
	II	1,718	6,012		
	III	1,830	6,406		
1	I	1,909	6,683	0,201	6,701
	II	1,863	6,519		
	III	1,972	6,900		
2,5	I	1,439	5,037	0,141	4,685
	II	1,457	5,100		
	III	1,119	3,917		
3,5	I	1,448	5,069	0,160	5,336
	II	1,566	5,481		
	III	1,559	5,459		

Lampiran 5 Analisis data

5.1 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease

Tests of Normality							
	Ph	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
AE	5	.354	3	.	.821	3	.165
	6	.208	3	.	.992	3	.826
	7	.266	3	.	.953	3	.581
	8	.244	3	.	.971	3	.674

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 5.1 Hasil Uji ANOVA Pengaruh Aktivitas Enzim Protease Terhadap pH

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	2.150	.172
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.000	11			

Interpretasi :

Analisis diatas menghasilkan statistic uji F sebesar 2,150 dengan probabilitas (sig) sebesar 0,172 ($F_{hitung} < F_{tabel} (4,46)$ atau probabilitas $> \alpha (\alpha = 0,05)$), sehingga H_0 diterima. Dengan demikian dinyatakan bahwa pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease tidak signifikan).

Tabel 5.2 Hasil Uji Lanjut Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Protease

	Ph	N	Subset for alpha = 0.05
			a
Tukey HSD ^a	6	3	.06596467
	7	3	.07284133
	5	3	.07592367
	8	3	.07695467

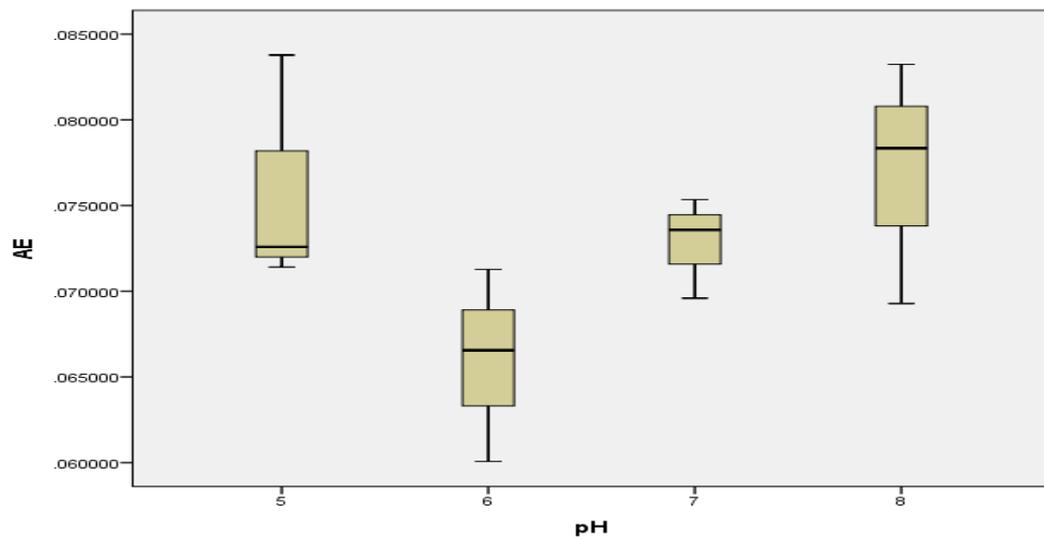
Description

AE

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
5	3	.07592367	.006831000	.003943880	.05895452	.09289281	.071405	.083782
6	3	.06596467	.005622214	.003245987	.05199831	.07993102	.060071	.071269
7	3	.07284133	.002949590	.001702947	.06551415	.08016852	.069592	.075350
8	3	.07695467	.007079693	.004087463	.05936773	.09454160	.069284	.083238
Total	12	.07292108	.006709817	.001936957	.06865787	.07718430	.060071	.083782
Sig.								.177

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Tests of Normality**

	konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
AE	50.0	.311	3	.	.898	3	.378
	100.0	.205	3	.	.993	3	.843

250.0	.368	3	.	.790	3	.091
350.0	.385	3	.	.750	3	.000

Tabel 5.3 Uji ANOVA pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	12.565	.002
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.001	11			

Interpretasi :

Analisis diatas menghasilkan statistic uji F sebesar 12,150 dengan probabilitas (sig) sebesar 0,002 (Fhitung > Ftabel (4,46) atau probabilitas < alpha ($\alpha = 0,05$)), sehingga H0 diterima. Dengan demikian dinyatakan bahwa pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease signifikan).

AE

	konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	250.0	3	.04684800		
	350.0	3	.05044467	.05044467	
	50.0	3		.06273100	.06273100
	100.0	3			.06700767
	Sig.			.796	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

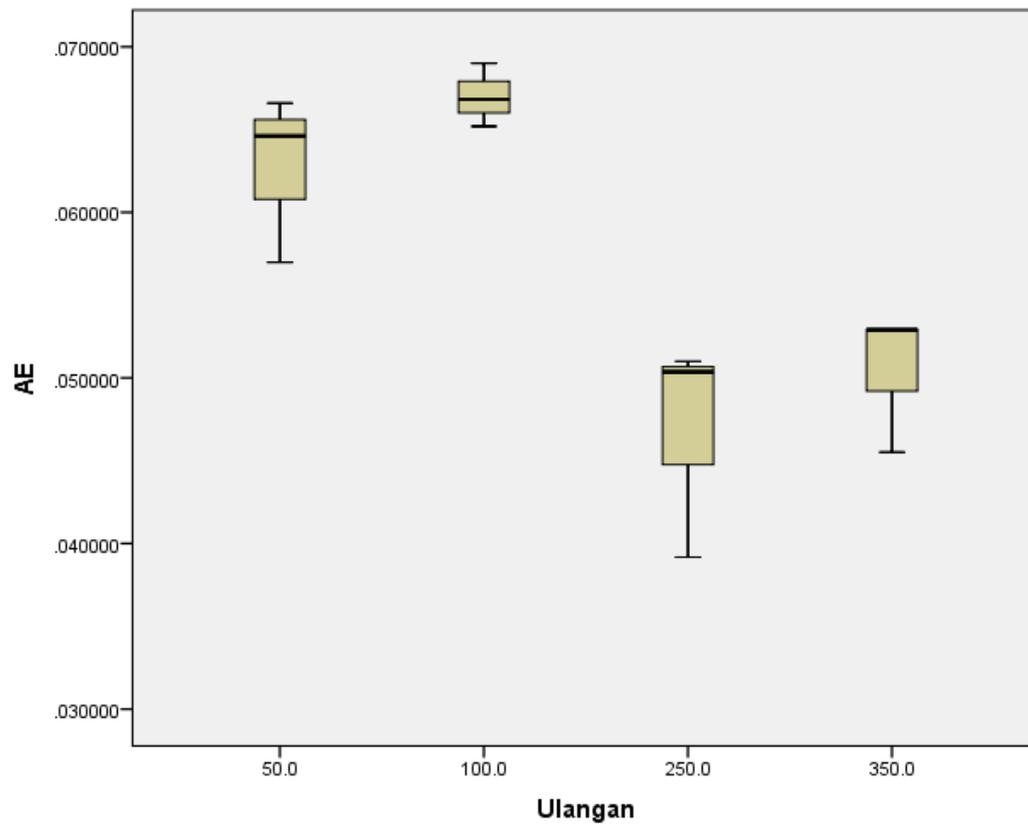
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Descriptives

AE

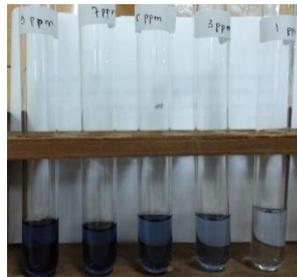
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					50.0	3		
100.0	3	.06700767	.001910987	.001103309	.06226051	.07175482	.065194	.069003
250.0	3	.04684800	.006656054	.003842874	.03031345	.06338255	.039171	.051004
350.0	3	.05044467	.004266618	.002463333	.03984580	.06104353	.045518	.052908

Total	12	.05675783	.009630336	.002780038	.05063901	.06287666	.039171	.069003
-------	----	-----------	------------	------------	-----------	-----------	---------	---------



Lampiran 6. Gambar Penelitian

Enzim protease



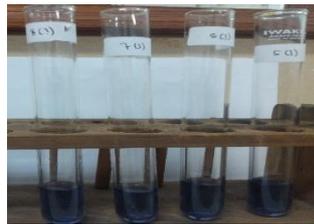
Kurva Standar Tirosin



pH



Konsentrasi Substrat



Uji Aktivitas Enzim Protease



Media SMB

