

**KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus* sp. PADA MEDIA  
YANG DIBERI NaCl HASIL PAPARAN MEDAN MAGNET 0,2 mT**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**NURAENI PRIJA AGUSTINA**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2017**

## ABSTRAK

### KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus* sp. PADA MEDIA YANG DIBERI NaCl HASIL PAPARAN MEDAN MAGNET 0,2 mT

Oleh  
Nuraeni Prija Agustina

Protease merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease berperan penting bagi semua makhluk hidup karena esensial dalam proses metabolisme protein serta banyak dimanfaatkan untuk kepentingan komersial pada sektor industri. Sejumlah upaya telah dilakukan untuk mendapatkan enzim protease, diantaranya dengan mengisolasi bakteri penghasil protease dan melakukan karakterisasi enzim dari ekstrak kasarnya.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui karakter enzim protease dari *Bacillus* sp. pada media yang kandungan NaCl dipapar medan magnet 0,2 mT. Produksi enzim dilakukan dengan dua perlakuan yaitu media kultur dan induktor NaCl tidak dipapar medan magnet (sebagai kontrol) sedangkan media kultur diberikan induktor NaCl 0,1% yang dipapar medan magnet 0,2 mT selama 10 menit (sebagai perlakuan). Karakterisasi enzim protease meliputi pH optimum, suhu optimum, aktivator dan inhibitor enzim. pH yang digunakan berkisar dari pH 4-12, suhu yang digunakan yaitu 25°C-70°C dengan rentang suhu 5°C, inhibitor yang digunakan yaitu EDTA sedangkan ion-ion logam yang digunakan antara lain MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, dan FeCl<sub>3</sub> masing-masing konsentrasi 1mM dan 5 mM. Penentuan Kinetika reaksi enzim dilakukan dengan menguji aktivitas protease pada kondisi pH dan suhu optimum dengan variasi konsentrasi substrat kasein yaitu 0, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 dan 2,50%. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Hasil yang diperoleh menunjukkan enzim protease (kontrol) optimum pada pH 8 dengan suhu inkubasi 30°C, dapat dihambat oleh EDTA, FeCl<sub>3</sub> (5mM) dan MnSO<sub>4</sub> (5mM) sedangkan aktivator enzim ini adalah MgCl<sub>2</sub> (5 dan 1 mM) dan CuSO<sub>4</sub> (1 mM). Nilai  $K_m = 2,48$  mM dan  $V_{maks} = 0,19$  U/ml. Sedangkan enzim protease (perlakuan) optimum pada pH 6 dengan suhu inkubasi 45°C, dapat dihambat oleh EDTA, FeCl<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub> dan CaCl<sub>2</sub> sedangkan aktivator enzim ini yaitu MgCl<sub>2</sub> dan CuSO<sub>4</sub> (1 mM). Hasil perhitungan  $V_{maks}$  dan  $K_m$  diperoleh nilai  $K_m = 51,43$  mM dan nilai  $V_{maks} = 2,34$  U/ml.

**Kata kunci:** *Bacillus* sp., Protease, Karakterisasi enzim, Medan magnet.

**KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus* sp.  
PADA MEDIA YANG DIBERI NaCl HASIL PAPARAN  
MEDAN MAGNET 0,2 mT**

**Oleh**

**NURAENI PRIJA AGUSTINA**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2017**

Judul Skripsi : **KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI  
*Bacillus* sp. PADA MEDIA YANG DIBERI NaCl  
HASIL PAPARAN MEDAN MAGNET 0,2 mT**

Nama Mahasiswa : **Nuraeni Prija Agustina**

No. Pokok Mahasiswa : 1317021058

Jurusan : Biologi


Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



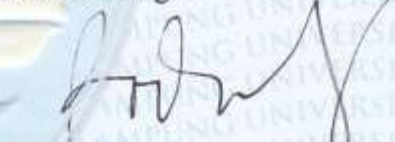
**MENYETUJUI**

**1. Komisi Pembimbing**

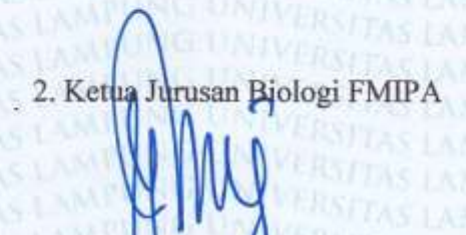
Pembimbing I

  
**Dr. Sumardi, M.Si.**  
NIP 19650325 199103 1 003

Pembimbing II

  
**Rochmah Agustrina, Ph.D.**  
NIP 19610803 198903 2 002

**2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA**

  
**Dra. Nuning Nurcahyani, M.Sc.**  
NIP 19660305 199103 2 001

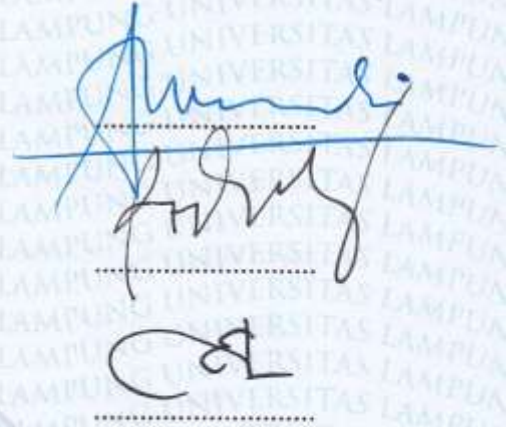
**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Sumardi, M.Si.**

Sekretaris : **Rochmah Agustrina, Ph.D.**

Penguji  
Bukan Pembimbing : **Dra. C.N. Ekowati, M.Si.**



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.**  
NIP. 19710212 199512 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **10 Agustus 2017**

## **RIWAYAT HIDUP**



Penulis dilahirkan di Tulang Bawang, pada tanggal 14 Agustus 1995. Penulis merupakan anak keempat dari lima bersaudara oleh pasangan Bapak Jaja Suharja dan Ibu Supriyati. Semasa kecil hingga dewasa ini, penulis bertempat tinggal di Perum Glora Persada Blok A no 7 Raja Basa, Bandar Lampung.

Penulis mulai menempuh pendidikan pertamanya di Taman Kanak-Kanak Melati pada tahun 2000. Pada tahun 2001, penulis melanjutkan pendidikannya di Sekolah Dasar Negeri 1 Raja Basa. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama Al-Kautsar Bandar Lampung pada tahun 2007. Pada tahun 2010 penulis melanjutkan pendidikannya di Sekolah Menengah Atas Al-Kautsar Bandar Lampung.

Pada tahun 2013, penulis tercatat sebagai salah satu mahasiswa Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Lampung melalui Jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN). Selama menjadi mahasiswa di Jurusan Biologi FMIPA Unila, Penulis pernah

menjadi asisten praktikum mata kuliah Mikrobiologi Umum, Mikrobiologi Pangan dan Industri, Fisiologi Mikroba dan Mikologi. Penulis juga aktif di Organisasi Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Unila sebagai Anggota Kaderisasi Bidang 1 pada tahun 2014-2015 dan Badan Eksekutif Mahasiswa Fakultas (BEMF) sebagai anggota PPSDM pada tahun 2014-2015.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Pancawarna, Kecamatan Wayserdang, Kabupaten Mesuji pada Januari-Maret 2016 dan melaksanakan Kerja Praktik di Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Serpong pada Juli-Agustus 2016 dengan judul **“Isolasi dan Karakterisasi Parsial Bakteri B1 dari *Crude Oil Tank* Limbah Pengolahan Kelapa Sawit Malimping Pandeglang Untuk Aplikasi Biodetergen di Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Serpong”**.

## *PERSEMBAHAN*

*بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ*

*Dengan mengucapkan rasa syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan*

*Rahmat, Ridho, dan Karunia-Nya yang tak henti-hentinya Dia berikan,*

*Kupersembahkan karya kecilku ini untuk:*

*Mama dan Papa tercinta yang senantiasa mengucapkan namaku dalam do'a,*

*mencurahkan kasih dan sayangNya untukku, serta selalu mendukung dan*

*memotivasi dalam setiap langkahku,*

*Ketiga kakakku serta adikku tersayang yang juga selalu mendo'akan dan*

*memberikan semangat,*

*Bapak dan Ibu Dosen yang selalu memberikanku ilmu yang bermanfaat, yang*

*membuat diriku memahami akan kebesaran ALLAH SWT dan membantuku*

*dalam menggapai kesuksesan,*

*Teman-teman, kakak-kakak, dan adik-adik yang selalu memberikanku*

*pengalaman berharga, motivasi, dan semangat,*

*serta Almamaterku tercinta.*



## MOTTO

*“ALLAH tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. ia mendapat pahala (dari kebaikan) yang diusahakannya dan ia mendapat siksa (dari kejahatan) yang dikerjakannya.”*  
(Al-Baqarah ayat 286)

*“Apa yang dibayangkan manusia menjadi KENYATAAN”*  
(Abraham Lincoln)

*“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”*  
(Al-Insyirah Ayat 5)

*“Kelihatannya semua itu mustahil sampai semuanya TERBUKTI”*  
(Nelson Mandela)

*”Barang siapa yang menghendaki kehidupan dunia maka wajib baginya memiliki ilmu, dan barang siapa yang menghendaki kehidupan Akhirat, maka wajib baginya memiliki ilmu, dan barang siapa menghendaki keduanya maka wajib baginya memiliki ilmu”.*  
(HR. Turmudzi)

*“Cobalah untuk tidak menjadi seorang yang SUKSES, tapi jadilah seorang yang BERNILAI”*  
(Albert Einstein)

## SANWACANA

*Alhamdulillahirobbil'amin,*

Puji dan syukur Penulis haturkan kepada ALLAH SWT , Dzat yang Maha Besar, Maha Memiliki Ilmu, serta lantunan sholawat beriring salam menjadi persembahan penuh kerinduan pada suri tauladan kita, Rasulullah Muhammad SAW.

Penulis telah menyelesaikan skripsi dengan judul “**KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus* sp. PADA MEDIA YANG DIBERI NaCl HASIL PAPARAN MEDAN MAGNET 0,2 mT**” yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Universitas Lampung.

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Bapak Dr. Sumardi, M.Si tahun 2017. Penghargaan dan ucapan terima kasih penulis haturkan kepada semua pihak yang telah berperan atas dorongan, bantuan, saran, kritik, dan bimbingannya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan, antara lain kepada :

1. Mama dan Papaku tercinta atas segala kasih sayang yang telah diberikan, do'a yang terus dipanjatkan, serta tak henti-hentinya memberikan nasihat, semangat dan motivasi kepada penulis.

2. Ketiga kakakku Nina Prijania Nurjannah, S.Pd., Imas Prija Komalasari, S.Si dan Azis Prija Juniansyah , serta adikku Farid Prija Ardiansyah, yang selalu memberikan semangat, do'a, serta tempat untuk berbagi canda tawa.
3. Bapak Dr. Sumardi, M.Si selaku Pembimbing 1 atas semua ilmu, bantuan, bimbingan, nasihat, saran, dan pengarahan, baik selama perkuliahan maupun dalam penyusunan skripsi.
4. Ibu Rochmah Agustrina, Ph.D. selaku Pembimbing 2 atas semua ilmu, bantuan, bimbingan, nasihat, saran, dan pengarahan, baik selama perkuliahan maupun penyusunan skripsi.
5. Ibu Dra. C. N. Ekowati, M.Si. selaku Pembahas atas semua ilmu, bantuan, bimbingan, nasihat, saran, dan pengarahan, baik selama perkuliahan maupun penyusunan skripsi.
6. Ir. Salman Farisi, M.Si. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama perkuliahan maupun dalam penyusunan skripsi.
7. Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P. selaku Rektor Universitas Lampung.
8. Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
9. Ibu Dra. Nuning Nurcahyani, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
10. Kepala Laboratorium Mikrobiologi, Kepala Laboratorium Biologi Molekuler, Pak Imron dan Mbak Nunung Cahyawati, A.Md. yang telah mengizinkan dan membantu penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium tersebut.

11. Seluruh Dosen dan Staf Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung, terima kasih telah banyak memberikan ilmu pengetahuan selama perkuliahan.
12. Rekan seperjuangan selama penelitian Yovita Selvie Pasaribu, Balqis Ananda Putri, Shofia Rodiah, Hafiz Auzar, Rizani Oktanisyah Putra dan Bella Rizcikal terimakasih atas bantuan, kebersamaan dan kerjasamanya selama penelitian berlangsung.
13. Sahabat-sahabatku Iffa Afiqa Khairani, Silvia Andriani, Oktarina Husaini, Nia Agniati, Retno Safitri, Nicken Fani, Prehandini, Yunita dan Galuh Kistiyan terimakasih telah menjadi partner terbaik, serta terimakasih atas do'a, dukungan, dan semangat yang telah diberikan.
14. Teman-teman terdekatku Lina Linda Wati, Nur Rohman, Hendra Verry Setyawan, Nungki Nuari Dewi, Sarah Niati, Dea Putri Andeska, Nailul Luthfiah, Rizka Devi Anggita, Fatmawati Putri, Carina Pertiwi, Eva Octarianita, Bella Noor, Vina Silviana, Mba Dian, Agung Setia Ningsih, Nadia Eka, Niswaton, Siti Meisita, dan I Nyoman Hitakarana yang selama di perkuliahan selalu ada untuk membantu, memberi saran, kritik, motivasi, dan semangat, serta sudah memberikan kenangan indah di perkuliahan.
15. Teman-teman Biologi Angkatan 2013 atas keakraban, canda tawa, dukungan, dan kebersamaannya selama ini yang telah kalian berikan.
16. Teman-teman KKN Desa Pancawarna, Kecamatan Wayserdang, Kabupaten Mesuji, Rendi Aulia Yudha, Milian Asha Bio, Andika Sofyan, Ridwan Cholik dan Martha atas bantuan dan kebersamaannya selama KKN hingga saat ini.

17. Seluruh kakak dan adik tingkat Jurusan Biologi FMIPA Unila yang tidak dapat disebutkan satu-persatu atas kebersamaannya di FMIPA, Universitas Lampung.
18. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah memberikan penulis dukungan, berbagai kritik dan saran,
19. Serta almamater Universitas Lampung yang tercinta.

Semoga segala kebaikan yang telah diberikan mendapat balasan kebaikan pula dari Allah SWT. Aamiin.

Demikianlah, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan pengetahuan baru kepada setiap orang yang membacanya.

Bandar Lampung, 10 Agustus 2017

**Nuraeni Prija Agustin**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>SAMPUL DEPAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN JUDUL DALAM</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>RIWAYAT HIDUP</b> .....	<b>vi</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>viii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ix</b>
<b>SANWACANA</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xvii</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
A. LatarBelakang .....	<b>1</b>
B. Tujuan Penelitian.....	<b>3</b>
C. ManfaatPenelitian.....	<b>4</b>
D. Kerangka Pikir.....	<b>4</b>
E. Hipotesis.....	<b>6</b>
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>7</b>
A. <i>Bacillus</i> sp .....	<b>7</b>
B. Enzim .....	<b>9</b>
C. Medan Magnet.....	<b>17</b>

<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
A. Waktu dan Tempat .....	22
B. Bahan dan Alat .....	22
C. Pelaksanaan Penelitian .....	23
D. Analisis Data .....	27
E. Diagram Alir Penelitian .....	28
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>29</b>
A. Uji Kualitatif Enzim Protease .....	29
B. Produksi Enzim Protease .....	31
C. Karakterisasi Enzim Protease .....	33
1. pH Optimum Aktivitas Enzim Protease .....	33
2. Suhu Optimum Aktivitas Enzim Protease .....	37
3. Daya Hambat Inhibitor dan Berbagai Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease .....	39
4. Penentuan Nilai $K_m$ dan $V_{maks}$ .....	43
<b>V. SIMPULAN .....</b>	<b>47</b>
A. Simpulan.....	47
B. Saran.....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. <i>Bacillus</i> sp. penghasil protease ekstraseluler .....	8
Tabel 2. Metode pengujian aktivitas enzim protease .....	25
Tabel 3. Indeks proteolitik <i>Bacillus</i> sp.....	30
Tabel 4. Aktivitas enzim pada produksi enzim protease.....	32
Tabel 5. Aktivitas enzim protease dengan media yang diberi induktor NaCl tanpa paparan medan magnet (kontrol) pada beberapa konsentrasi substrat .....	43
Tabel 6. Aktivitas enzim protease dengan media yang diberi induktor hasil paparan medan magnet (perlakuan) pada beberapa konsentrasi substrat .....	44
Tabel 7. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease .....	56
Tabel 8. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease.....	57
Tabel 9. Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim protease (kontrol) .....	58
Tabel 10. Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim protease (perlakuan) .....	59



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Teori kunci gembok dan teori induksi.....	10
Gambar 2. Hubungan suhu dengan aktivitas enzim.....	11
Gambar 3. Hubungan pH dengan aktivitas enzim .....	12
Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim .....	12
Gambar 5. Arah gaya medan magnet.....	17
Gambar 6. Kaidah tangkapan .....	18
Gambar 7. Diagram alir penelitian.....	28
Gambar 8. Indeks proteolitik <i>Bacillus</i> sp.....	29
Gambar 9. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease .....	34
Gambar 10. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease.....	37
Gambar 11. Pengaruh inhibitor dan 1 mM Ion logam terhadap aktivitas enzim protease .....	39
Gambar 12. Pengaruh inhibitor dan 5 mM Ion logam terhadap aktivitas enzim protease .....	42
Gambar 13. Grafik hubungan $1/[S]$ dan $1/V$ pada enzim protease (kontrol) .....	44
Gambar 14. Grafik hubungan $1/[S]$ dan $1/V$ pada enzim protease (perlakuan) .....	45
Gambar 15. Hasil uji aktivitas enzim protease (blanko, standard dan sampel).....	62

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Protease merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease berperan penting bagi semua makhluk hidup karena esensial dalam proses metabolisme protein, antara lain membantu pencernaan protein dalam makanan dan menggunakan kembali protein intraseluler sebagai enzim, hormon, serta neurotransmitter. Protease banyak dimanfaatkan untuk kepentingan komersial pada berbagai industri seperti industri detergen, produk-produk kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, bir, film dan limbah (Nascimento dan Martins, 2006).

Enzim protease dapat diproduksi oleh mikroba proteolitik baik dari kapang maupun bakteri. Bakteri yang mampu menghasilkan enzim protease adalah dari genus *Bacillus* antara lain *B. licheniformis*, *B. amylolique*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. Thermoproteolyticus* (Nascimento dan Martins, 2006).

*Bacillus* terdapat dalam saluran pencernaan hewan dan menghasilkan enzim ekstraseluler seperti protease, lipase, amilase, dan selulase. Enzim-enzim tersebut berperan membantu pencernaan dalam tubuh hewan.

Aktivitas katalitik suatu enzim dipengaruhi oleh struktur protein penyusunnya. Struktur protein sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya suhu, pH, ion-ion logam dan juga paparan medan magnet (Campbell dan Farrell, 2006). Perubahan suhu dan pH lingkungan enzim dapat mempengaruhi aktivitas enzim, stabilitas dan kecepatan reaksi karena peningkatan atau penurunan pH dapat menyebabkan terganggunya ikatan-ikatan non kovalen (ikatan hidrogen, ikatan van der Waals, dan ikatan hidrofobik) yang menstabilkan bentuk aktif enzim (Hames dan Hooper, 2000).

Menurut Mira *et al.* (2015) aktivitas protease dari isolat bakteri *Bacillus* sp. M1-23 mempunyai aktivitas tertinggi pada suhu inkubasi 55°C dan pH 7,5. Penelitian yang dilakukan Kurniawan (2011) menunjukkan aktivitas protease dari isolat *Bacillus* sp. TPT-20 mempunyai aktivitas tertinggi pada suhu inkubasi 55°C dan pH 8.

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh ketersediaan garam-garam mineral seperti NaCl dan amonium sulfat. Wardania dan Lia (2012) melaporkan bahwa penambahan garam amonium sulfat menyebabkan pengendapan

protein dan penurunan jumlah kontaminan yang menghalangi sisi aktif enzim untuk berikatan dengan substrat. Paparan medan magnet pada NaCl dari luar akan menyebabkan dimensi atau bidang dipol molekul NaCl searah sehingga mempengaruhi gelombang elektromagnetik yang melewatinya (Abadi, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi (2016) membuktikan adanya pengaruh paparan medan magnet 0,2 mT selama 10 menit pada media produksi enzim protease dari *Bacillus* sp. Protease yang diproduksi pada media produksi yang diberi NaCl hasil paparan medan magnet mampu meningkatkan aktivitas protease. Penelitian mengenai enzim protease tersebut belum diketahui karakteristiknya. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik enzim protease berdasarkan pH, suhu, aktivator dan inhibitor serta nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .

## **B. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim protease dari *Bacillus* sp. pada media yang diberi NaCl hasil paparan medan magnet 0,2 mT. Karakter enzim yang diamati adalah meliputi pH optimum, suhu optimum, aktivator dan inhibitor yang mempengaruhi aktivitas enzim serta nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .

### C. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini akan memberikan :

1. Informasi ilmiah tentang pengaruh pemberian NaCl yang dipapar medan magnet 0,2 mT terhadap karakter enzim protease dari *Bacillus* sp. yang ditentukan berdasarkan pH, suhu, aktivator, inhibitor serta nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .
2. Diperoleh cara untuk meningkatkan enzim protease oleh *Bacillus* sp. dengan memanfaatkan medan magnet.

### D. Kerangka Pikir

Aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh setiap organisme berbeda tergantung kepada karakternya. Mengetahui sifat dan karakter suatu enzim sangat penting untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas enzim. Pada kondisi yang optimum, enzim akan bekerja maksimal. Kondisi lingkungan yang mempengaruhi karakter enzim antara lain: suhu, pH, ion-ion logam, dan paparan medan magnet.

Pengaruh paparan medan magnet terhadap aktivitas enzim akan lebih kuat ketika media diberi logam yang berfungsi sebagai kofaktor enzim. Kofaktor enzim memiliki kemampuan dalam mengaktifkan atau meningkatkan kerja enzim. Molekul-molekul atau ion-ion yang berperan sebagai kofaktor umumnya terdapat dalam bentuk garam-garam mineral seperti diantaranya NaCl.

Penambahan NaCl dalam media produksi dapat menyebabkan adanya perubahan ionisasi, mempengaruhi kestabilan molekul protein dan mempengaruhi kecepatan reaksi enzim.

Hasil penelitian sebelumnya membuktikan bahwa ion  $\text{Na}^+$  dari kristal NaCl dalam media kultur yang dipapar medan magnet 0,2 mT meningkatkan aktivitas enzim protease. NaCl yang dipapar medan magnet dapat menstabilkan enzim dengan cara menetralkan kelebihan muatan elektrostatis yang melindungi molekul enzim sehingga konformasi enzim dapat dipertahankan. NaCl juga terlibat dalam proses katalisis enzim dengan membantu pengikatan substrat ke sisi aktif enzim sehingga memudahkan terjadinya interaksi antara gugus kimia substrat dan gugus R (rantai samping) asam amino protein. Hal tersebut menyebabkan enzim berubah bentuk dan situs aktif semakin efektif dalam mengkatalisis perubahan substrat menjadi produk. Kecepatan situs aktif dalam mengubah substrat menjadi produk berpengaruh terhadap laju reaksi yang dihasilkan. Laju reaksi yang tinggi menyebabkan meningkatnya aktivitas enzim tersebut.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui “ Karakter enzim protease dari *Bacillus* sp. pada media yang mengandung NaCl hasil paparan medan magnet 0,2 mT”. Karakterisasi enzim protease dilakukan pada faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi aktivitas enzim yaitu suhu dan pH, aktivator dan inhibitor, serta nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  yang dapat menghasilkan aktivitas protease optimum.

Pada kondisi optimum maka kerja enzim akan maksimal sehingga proses pembentukan kompleks enzim-substrat semakin mudah dan produk yang dihasilkan meningkat.

#### **E. Hipotesis**

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah diperoleh pH buffer, suhu, inhibitor enzim serta nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  yang dapat memberikan aktivitas maksimum protease dari *Bacillus* sp. pada media yang diberi NaCl hasil paparan medan magnet 0,2 mT.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. *Bacillus* sp.

*Bacillus* sp. termasuk spesies yang hidup bebas dan dapat ditemukan di udara, air, debu, tanah, dan saluran pencernaan hewan (Wongsa dan Werukhamkul, 2007). *Bacillus* sp. merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang dengan ukuran  $0,3 - 2,2 \mu\text{m} \times 127 - 7,0 \mu\text{m}$ . *Bacillus* sp. diketahui bersifat aerob namun ada sebagian spesiesnya yang bersifat anaerob fakultatif. Pengujian bakteri dengan uji katalase menunjukkan bahwa *Bacillus* memiliki kemampuan katalase positif (Pelczar dan Chan, 2005).

Menurut Whitman (2009) klasifikasi *Bacillus* sp. adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Familia	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus</i> sp.



*Bacillus* mempunyai sifat fisiologis yang khas diantaranya: (1) mampu mendegradasi senyawa organik yang diperoleh dari tumbuhan dan hewan seperti selulosa, pati, pektin, agar-agar, hidrokarbon dan protein, (2) mampu menghasilkan antibiotik, dan (3) berperan dalam proses nitrifikasi, denitrifikasi dan fiksasi nitrogen di alam (Yusufa *et al.*, 2013).

*Bacillus* sp. memiliki berbagai kemampuan enzimatik dan menghasilkan enzim ekstraseluler yang berperan penting dalam mendegradasi senyawa-senyawa organik lipase, amilase, selulase, xilanase dan protease yang tersedia dilingkungan tumbuhnya (Nascimento dan Martins, 2006). Nugroho (1999) menemukan beberapa jenis *Bacillus* penghasil enzim protease ekstraseluler dengan pH optimum yang berbeda untuk setiap jenisnya seperti tertera dalam tabel berikut.

Tabel 1. *Bacillus* penghasil protease ekstraseluler

Species	Jenis protease	pH optimum
<i>B. cereus</i>	netral	7.0
<i>B. licheniformis</i>	netral	6.5 - 7.5
<i>B. megaterium</i>	netral	7.0
<i>B. polymixa</i>	netral	6.0 – 7.2
<i>B. stearothermophilus</i>	netral	6.9 – 7.2
<i>B. amyloliquefaciens</i>	alkali	10.2 – 10.7
<i>B. subtilis</i> var <i>amyloliquefaciens</i>	netral	7.0

## B. Enzim

### 1) Fungsi Enzim

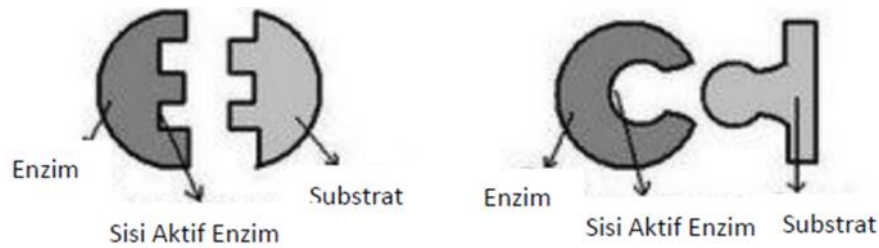
Enzim merupakan molekul *biopolymer polypeptide* dengan susunan monomer asam amino yang teratur dan berperan dalam mengkatalisis suatu reaksi (Mittal, 2007). Fungsi katalitik berlangsung dalam berbagai reaksi seperti oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer gugus, pemutusan rantai karbon, dan hidrolisis (Sumardjo, 2006).

Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi. Dalam suatu reaksi, enzim akan mengikat molekul substrat menjadi kompleks enzim-substrat kemudian kompleks tersebut terurai membentuk enzim bebas dan produk (Campbell *et al.*, 2008).

Menurut Mittal (2007) terdapat dua teori pembentukan kompleks enzim-substrat (1) Teori *lock and key* (gembok dan kunci). Teori gembok-kunci menjelaskan bahwa substrat yang spesifik (polar) akan terikat pada sisi aktif enzim (non-polar) dengan bentuk dan muatan pasangan substrat.

Rantai peptida yang mengandung rantai residu pada protein (enzim) menuntun substrat untuk berinteraksi dengan residu katalitik.

(2) Teori *induced-fit* (ketetapan induksi). Teori ketetapan induksi menjelaskan bahwa enzim bersifat fleksibel dan akan terinduksi untuk menyesuaikan bentuknya dengan bentuk substrat. Kedua teori kompleks enzim-substrat diilustrasikan pada Gambar 1.



Gambar 1. (a) Teori kunci gembok dan (b) teori induksi (Mittal, 2007).

Fungsi katalitik enzim dalam suatu reaksi memiliki sifat-sifat spesifik sebagai berikut: enzim hanya bekerja pada substrat tertentu, mengkatalisis tanpa produk samping, mempunyai produktivitas yang tinggi, lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalisator sintetik, dan ramah lingkungan (Campbell *et al.*, 2008).

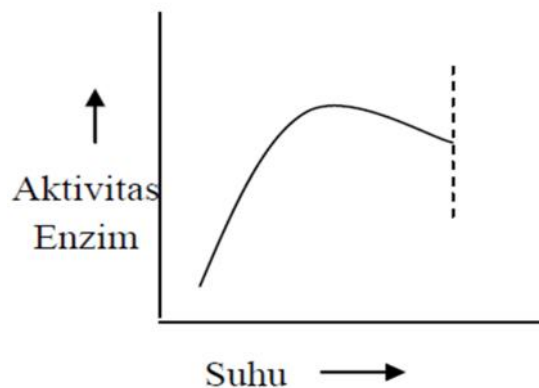
Berdasarkan aktivitasnya, enzim dibagi menjadi 2 golongan, yaitu (a) endoenzim adalah enzim yang dihasilkan di dalam sel dan melakukan proses metabolisme di dalam sel, sedangkan (b) eksoenzim adalah enzim yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel ke dalam media tumbuh bakteri dan akan bereaksi sendiri dengan substrat organik yang di degradasinya tanpa bergantung pada selnya (Campbell *et al.*, 2013).

Seperti diuraikan di atas, aktivitas bakteri dalam memproduksi enzim sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan diantaranya pH, suhu, jumlah enzim atau produk, substrat serta ion-ion logam (Mittal, 2007). Aktivitas katalitik suatu enzim juga dipengaruhi oleh struktur

protein penyusunnya. Struktur protein sendiri sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan diantaranya:

a. Suhu

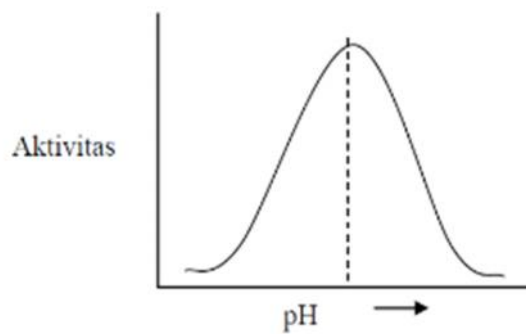
Aktivitas enzim akan terus mengalami peningkatan sampai suhu optimum tercapai. Pemanasan yang semakin tinggi menyebabkan penurunan aktivitas enzim sebagai akibat denaturasi enzim (Sumardjo, 2009). Perubahan suhu akan mempengaruhi aktivitas, stabilitas dan kecepatan reaksi karena peningkatan atau penurunan selalu menyebabkan putusya ikatan non kovalen (ikatan hidrogen, ikatan van der Waals, dan ikatan hidrofobik) yang terdapat pada struktur 3D enzim (Hames dan Hooper, 2000).



Gambar 2. Hubungan suhu dengan aktivitas enzim (Shahib, 2005).

b. pH (tingkat keasaman)

Enzim membutuhkan pH optimal untuk mendapatkan aktivitas yang optimal. Kondisi pH yang terlalu asam atau terlalu basa dapat menyebabkan enzim terdenaturasi (Campbell, 2002).

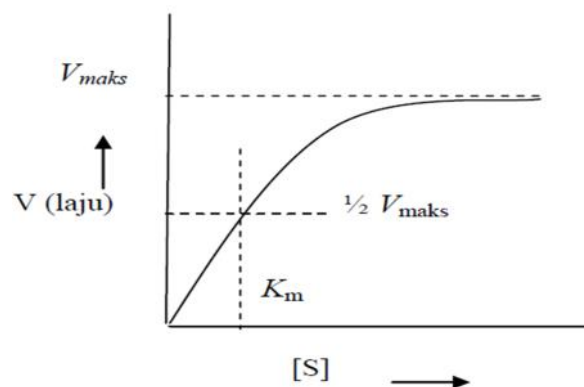


Gambar 3. Hubungan pH dengan aktivitas enzim (Shahib, 2005).

c. Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi enzim. Kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat begitupun sebaliknya konsentrasi substrat yang rendah akan menurunkan kecepatan reaksi (Mittal, 2007).

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan awal reaksi enzimatik dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hubungan konsentrasi substrat dengan laju reaksi enzim

d. Kinetika Reaksi Enzim

Kinetika reaksi enzim adalah studi reaksi kimia yang dikatalisis oleh enzim. Reaksi enzimatik tersebut berlangsung melalui proses pembentukan kompleks enzim substrat (ES), Jika enzim dalam keadaan jenuh terhadap substrat maka laju reaksi akan mencapai nilai maksimum.

Laju reaksi sebanding dengan penambahan konsentrasi substrat hingga konsentrasi substrat tidak lagi berpengaruh terhadap laju reaksi maka laju reaksi mencapai nilai maksimum ( $V_{maks}$ ). Pada saat  $V_{maks}$  tercapai, semua molekul enzim telah berikatan dengan substrat dan membentuk kompleks enzim substrat (Campbell, 2013). Metode analisis kuantitatif kinetika reaksi enzim dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan Michaelis-Menten.

Persamaan Michaelis-Menten merupakan persamaan kecepatan reaksi enzimatik yang menyatakan hubungan kuantitatif kecepatan reaksi awal ( $V_0$ ), kecepatan reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ), konsentrasi substrat ( $S$ ) dan konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) (Murray, 2003).

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad \frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks} [S]}$$

Konsentrasi Michaelis-Menten ( $K_m$ ) merupakan konstanta yang digunakan untuk mengetahui afinitas enzim terhadap substratnya. Nilai  $k_m$  menunjukkan konsentrasi substrat pada kondisi pH dan suhu optimum. Nilai  $K_m$  tinggi jika konsentrasi substrat sudah menyebabkan kecepatan reaksi mencapai setengah kecepatan maksimumnya. Dalam kondisi ini, maka enzim tidak lagi mempunyai afinitas terhadap substratnya (Amin, 2008).

e. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator merupakan suatu zat yang memiliki kemampuan dalam mengaktifkan dan meningkatkan kerja enzim sedangkan

inhibitor merupakan zat yang dapat menghambat kerja enzim. Inhibitor reversibel berikatan dengan enzim secara reversibel sehingga dapat dilepas kembali dengan proses dialisis sehingga aktivitas enzim pun kembali. Inhibitor irreversibel berikatan kuat dengan enzim sehingga tidak dapat dilepaskan dengan cara dialisis (Awaliatul, 2011).

Berdasarkan jenis zatnya aktivitas enzim dibedakan menjadi koenzim dan kofaktor. Koenzim adalah aktivator yang berupa senyawa organik, sedangkan kofaktor adalah aktivator yang berupa logam non organik. Contoh kofaktor antara lain :  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  dan  $\text{Na}^+$ . Logam yang berfungsi sebagai kofaktor tersedia dalam bentuk garam-garam mineral seperti  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7)_3$  dan  $\text{NaCl}$  (Moat *et al.*, 2002).

$\text{NaCl}$  merupakan elektrolit kuat yang membentuk partikel bermuatan ion (Rahardianto *et al.*, 2012). Ion tersebut dapat menjaga keseimbangan kepekatan larutan dengan kepekatan cairan yang berada disekitar membran plasma. Penambahan  $\text{NaCl}$  dalam media produksi dapat menyebabkan adanya perubahan ionisasi, mempengaruhi kestabilan molekul protein dan mempengaruhi kecepatan reaksi enzim. Hal tersebut mempermudah proses pembentukan enzim-substrat sehingga produk yang dihasilkan banyak dan aktivitas enzim pun semakin tinggi. Penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi (2016) membuktikan bahwa peningkatan aktivitas enzim protease dipengaruhi oleh ion  $\text{Na}^+$  dari kristal  $\text{NaCl}$  dalam media kultur yang dipapar medan magnet 0,2 mT.

## 2) Enzim Protease

Salah satu enzim yang tergolong ke dalam enzim eksoenzim adalah protease. Protease termasuk ke dalam enzim hidrolase karena untuk aktivitasnya membutuhkan  $H_2O$ . Protease merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino dengan cara memindahkan gugus fungsional ke air (Poedjiadi *et al.*, 2009).

Protease berperan penting bagi semua makhluk hidup karena esensial dalam proses metabolisme protein, membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein intraseluler sebagai enzim, hormon, serta neurotransmitter. Di dalam sistem pencernaan makanan, keberadaan protease menghasilkan pemecahan ikatan peptida protein menjadi asam-asam amino sehingga mudah diabsorpsi (Moat *et al.*, 2002).

Beynon (2001) menjelaskan bahwa berdasarkan sisi aktifnya dalam proses pemutusan ikatan peptida protein, enzim protease dibagi menjadi dua yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase adalah enzim protease yang mengkatalisis ikatan peptida pada ujung-ujung rantai polipeptida dari arah luar, sedangkan endopeptidase adalah enzim protease yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein dari bagian dalam.



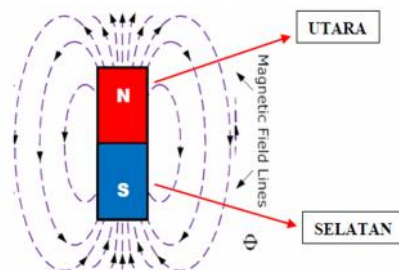
Berdasarkan mekanisme reaksi dan residu sisi aktifnya, endoprotease digolongkan menjadi 4 yaitu (1) protease serin merupakan enzim yang memiliki asam amino serin pada sisi aktifnya dan dapat dihambat oleh fenil metil sulfonil flourida (PMSF) serta diisopropil flouro fosfat (DFP), (2) protease sulfidril atau protease thiol merupakan protease yang memiliki asam amino sistein pada sisi aktifnya, (3) protease asam merupakan enzim yang aktif pada pH asam dan tahan terhadap inhibitor protease serin serta EDTA, (4) protease logam merupakan enzim yang memiliki aktivitas maksimum pada pH netral dan dihambat oleh EDTA (Beynon, 2001 ).

Aktivitas protease dipengaruhi oleh jumlah enzim atau produk, substrat, kofaktor, koenzim, aktivator, pH dan suhu (Mittal, 2007). Semakin tinggi kandungan asam amino yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis suatu protein maka aktivitas proteasenya semakin tinggi (Yusriah dan Kuswytasan, 2013). Menurut Mira *et al.* (2015) produksi protease dari isolat bakteri *Bacillus* sp. M1-23 mempunyai aktivitas tertinggi pada lingkungan dengan suhu 55°C dan optimum pada pH lingkungan 7,5. Penelitian yang dilakukan oleh Lakshmi (2014) menunjukkan bahwa penambahan sekam padi dan potasium nitrat sebagai substrat pada medium tumbuh *Bacillus licheniformis* menghasilkan aktivitas protease tertinggi pada lingkungan dengan pH 9 dan optimum pada suhu inkubasi 37°C.

### C. Medan Magnet

Medan magnet merupakan daerah di sekitar magnet yang masih dipengaruhi oleh gaya magnetiknya sehingga gerakan muatan di sekelilingnya masih dapat dipengaruhi oleh gaya medan magnet (Halliday dan Resnick, 1999). Magnet secara umum dapat dibedakan menjadi dua (a) Magnet alami yaitu bahan yang menghasilkan medan magnet dengan besaran yang tetap. (b) Magnet buatan merupakan bahan yang menghasilkan medan magnet dengan sifat kemagnetan sementara dan besarnya medan magnet yang diinginkan dapat dibuat dengan cara menyesuaikan sumber penghasil medan magnetnya (Angraini, 2012 ).

Salah satu sumber medan magnet buatan adalah solenoida (Halliday dan Resnick, 1999). Solenoida adalah kumparan kawat yang di aliri arus listrik. Arus listrik pada solenoida menghasilkan medan magnet dengan pola garis-garis medan seperti garis-garis medan pada medan magnet batang (Soedoyo, 2000). Garis-garis medan magnet bergerak dari arah kutub utara ke arah kutub selatan (Halliday dan Resnick, 1999). Arah gaya medan magnet dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5. Arah gaya medan magnet (Angraini, 2012).

Solenoida dapat menimbulkan induksi magnetik. Induksi magnetik merupakan perubahan medan magnetik yang menimbulkan arus listrik atau medan total (Ishag, 2007). Induktansi solenoida bergantung pada sifat bahan ( $\mu_0$ ), banyak nya lilitan (N) dan luas penampang (A). Besarnya medan magnet di ujung sumbu solenoid dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut

$$B = \frac{\mu_0 \times N \times I}{2 \times L}$$

Keterangan :

B = besar medan magnet pada pusat solenoida dalam tesla (T)

$\mu_0$  = permeabilitas ruang hampa =  $4 \cdot 10^{-7}$  Wb/amp. M

N = jumlah lilitan dalam solenoida

i = kuat arus listrik dalam ampere (A)

L = tinggi solenoida dalam meter (m).

Arah arus medan magnetik dapat ditentukan dengan menggunakan kaidah tangan kanan. Kaidah tangan kanan berarti: jika empat jari tangan kanan kita mengepal menunjukkan arah medan magnet di sekitar kawat berarus dan ibu jari tangan kanan menyatakan arah arus listrik (Gambar 6).



Gambar 6. Kaidah tangan kanan (Angraini, 2012).

Berdasarkan uraian di atas yang menjelaskan bahwa semua benda di alam memiliki sifat kemagnetannya, maka setiap organisme akan dipengaruhi oleh keberadaan medan magnet. Paparan medan magnet diketahui menyebabkan perubahan pada metabolisme sel serta pertumbuhan organisme (Setyasih, 2012).

Berdasarkan sifat kemagnetannya, semua unsur yang berada di alam dikelompokkan menjadi bahan yang bersifat paramagnetik, ferromagnetik, dan diamagnetik. (1) Bahan paramagnetik merupakan bahan yang dipengaruhi oleh medan magnet luar sehingga momen dipolnya menjadi terarah. Hal ini menyebabkan unsur yang bersifat paramagnetik tidak mampu mempertahankan magnetismenya karena bergantung pada medan magnet luar tersebut (Alonso dan Finn, 1992). (2) ferromagnetik merupakan bahan yang tetap memiliki sifat kemagnetan walaupun tidak dipengaruhi oleh medan magnet luar (3) diamagnetik merupakan bahan yang memiliki kemampuan dalam merespon gaya magnetnya rendah. Jika bahan diamagnetik ini diberikan medan magnet luar maka elektron-elektron dalam atom akan mengubah gerakannya sehingga menyebabkan efek tolak menolak (Alonso dan Finn, 1992).

Menurut Abadi (2005) larutan NaCl yang diberikan paparan medan magnet dari luar menyebabkan momen dipol dari molekul-molekul NaCl menjadi terarah. Sifat polarisasi magnet dari NaCl juga dipengaruhi oleh keberadaan medan magnet di sekitarnya. Perubahan sudut polarisasi yang dialami NaCl

sebesar 0,125 molal. Medan magnet juga diketahui mampu menurunkan laju presipitasi partikel-partikel larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan  $\text{CaCl}_2$  sehingga partikel dalam larutan tersebut dalam keadaan bergerak terus sehingga mikroorganisme dapat dengan mudah menggunakannya (Hernawati, 2015).

Pemaparan medan magnet juga dapat menyebabkan ikatan penyusun protein terlepas sehingga protein mengalami perubahan pada struktur molekulnya dan terdenaturasi (Poedjadi, 2009).

Menurut Morejon *et al.* (2007) pemaparan medan magnet pada tanaman meningkatkan kecepatan perkecambahan karena adanya peningkatan enzim yang mengkatalis reaksi dalam proses metabolisme.

Penelitian yang dilakukan oleh Hernawati (2015) membuktikan bahwa pemaparan medan magnet 0,2 mT menunjukkan aktivitas enzim selulase sebesar 50%. Pourakbar (2012) menjelaskan bahwa aktivitas enzim amilase, dehidrogenase dan protease dari biji *Satureia hortensis* L. yang dipapar medan magnet dengan kuat medan magnet 0 mT, 25 mT, 50 mT, dan 75 mT lebih besar daripada biji yang tidak terpapar medan magnet. Rohma (2013) membuktikan bahwa kuat medan magnet 0,1 mT dengan lama paparan 15'36" dapat meningkatkan aktivitas enzim -amilase pada kacang merah dan kacang buncis hitam.

Aktivitas enzim protease dapat ditingkatkan dengan pemberian konsentrasi NaCl yang tinggi (Paada, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Noha (2014) membuktikan bahwa NaCl dengan konsentrasi 1M – 3,1M dapat meningkatkan aktivitas protease AbCP dari *Alkalibacillus* sp. NM-Fa<sub>4</sub>. Penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi (2016) membuktikan bahwa peningkatan aktivitas enzim protease juga dipengaruhi oleh ion Na<sup>+</sup> dari kristal NaCl dalam media kultur yang dipapar medan magnet 0,2 mT.

## II. METODE KERJA

### A. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada Februari sampai April 2017 di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Unila untuk kultur bakteri dan di Laboratorium Botani FMIPA Unila untuk pemberian medan magnet dan uji aktivitas enzim.

### B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: isolat *Bacillus* sp. yang diperoleh dari koleksi biakan di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA. Unila, media Mendels (Mendels dan Elwyn, 1956) yang dimodifikasi, larutan buffer, asam trikloroasetat (TCA) , peraksi folin dan NaCl yang digunakan sebagai induksan dari medan magnet terhadap pertumbuhan dan aktivitas *Bacillus* sp.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: peralatan gelas, jarum ose, *spectrophotometer*, *autoclave*, oven, bunsen, *hot plate magnetic stirrer*, inkubator, pH meter, sentrifuge, medan magnet, *shaker incubator* dan *laminar airflow*.

## C. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara bertahap. Tahap pertama, peremajaan *Bacillus* sp. dan uji kualitatif enzim protease. Tahap kedua, produksi enzim protease pada media cair Mendels yang dimodifikasi dan diinduksi oleh NaCl hasil paparan medan magnet. Tahap ketiga, pengujian aktivitas protease. Tahap keempat, karakterisasi enzim protease meliputi suhu, pH, aktivator dan inhibitor enzim serta nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .

### 1. Tahap Pertama

#### a. Peremajaan Inokulum *Bacillus* sp.

Biakan murni bakteri *Bacillus* sp. diambil 1 ose dan dipindahkan ke media Mandels yang dimodifikasi dengan komposisi : susu (protein) 0,5% , yeast extract 0,35%, trypton water 0,35%, NaCl 0,2%,  $KH_2PO_4$  0,245%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,035%, dan  $(NH_4)_2SO_4$  0,175% serta ditambahkan Agar Bakteriological 1,5 %. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### b. Uji Kualitatif Enzim Protease

Media Mendels yang dimodifikasi dibuat dengan ditambahkan agar bakteriological 1,5 %. Kemudian diberi induktor NaCl 0,1% hasil paparan medan magnet 0,2 mT selama 10 menit dan dicampurkan ke dalam media Mendels, sedangkan sebagai kontrol, induktor NaCl 0,1% tidak dipapar medan magnet.



Satu ose isolat *Bacillus* sp. diinokulasikan pada media uji. Kultur diinkubasi selama 18 jam dalam inkubator pada suhu 40°C.

Kemudian diamati zona jernih disekitar koloni bakteri yang tumbuh. Terbentuknya zona jernih menunjukkan adanya aktivitas enzim protease. Koloni bakteri dan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri diukur diameternya dan ditentukan Indeks Proteolitik (IP):

$$IP = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

(Agustien, 2010).

## 2. Tahap Kedua

### a. Produksi enzim protease pada media cair mendels yang dimodifikasi dan NaCl yang Dipapar Medan Magnet 0.2 mT

*Bacillus* sp. diinokulasikan pada media Mendels cair kemudian diinkubasi pada inkubator goyang selama 24 jam. Kultur yang terjadi digunakan sebagai starter. 5 ml starter *Bacillus* sp.

diinokulasikan ke dalam media produksi yang diberi induktor NaCl 0,1% hasil paparan medan magnet 0,2 mT selama 10 menit.

Sebagai kontrol, media produksi diberi induktor NaCl 0,1% yang tidak dipapar medan magnet. Kultur diinkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 40°C selama 24 jam. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan agitasi 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah terjadinya

kerusakan struktur enzim dan sel akan mengendap karena adanya gaya gravitasi, sedangkan enzim tetap terlarut dalam supernatan. Cairan supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak kasar enzim protease untuk menentukan aktivitasnya.

### 3. Tahap Ketiga

#### a. Uji Aktivitas Protease

Aktivitas protease diukur dengan mengikuti metode Bergmeyer dan Grassl (1983) yang disajikan pada tabel 2 berikut.

Tabel 2. Metode Pengujian Aktivitas Enzim Protease

	<b>Blanko (ml)</b>	<b>Standar (ml)</b>	<b>Sampel (ml)</b>
Kasein 2 mM dalam buffer fosfat (0.01) M pH 7	0.5	0.5	0.5
Ekstrak kasar enzim	-	-	0.1
Tirosin standar	-	0.1	-
Aquades	0.1	-	-
Inkubasi pada suhu 40 <sup>0</sup> C selama 10 menit			
TCA (0.1 M)	0.5	0.5	0.5
Enzim	0.1	0.1	-
Aquades	-	-	0.1
Inkubasi pada suhu 37 <sup>0</sup> C selama 10 menit			
Sentrifugasi 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 <sup>0</sup> C			
Supernatan	0.375	0.375	0.375
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.4 M)	1.25	1.25	1.25
Pereaksi folin (1:2)	0.25	0.25	0.25
Inkubasi pada suhu 37 <sup>0</sup> C selama 10 menit			
Baca absorbansi pada panjang gelombang 578 nm			

(Zilda, 2008).

Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu  $\mu\text{mol}$  tirosin per menit pada kondisi pengukuran diukur menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{PU} = \frac{A_{\text{sp}} - A_{\text{bl}}}{A_{\text{st}} - A_{\text{bl}}} \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

PU : Unit Aktivitas Protease (Unit/ml)

Asp : Nilai Absorbansi Sampel

Ast : Nilai Absorbansi Standar

Abl : Nilai Absorbansi Blanko

T : Waktu

#### 4. Tahap Keempat

##### a. Penentuan pH Optimum Untuk Aktivitas Enzim Protease

Optimasi pH dilakukan dengan menggunakan buffer sitrat pada pH 4-5, fosfat pada pH 6-7, Tris HCL pada pH 8-9 dan gylisin-NaOH pada pH 10-12. Ekstrak kasar enzim ditambahkan ke dalam buffer dengan pH yang ditentukan kemudian diinkubasi pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$ , dilanjutkan dengan pengukuran aktivitas enzim mengikuti metode Bergmeyer dan Grassl (1983). pH buffer yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi menunjukkan pH optimum.

##### b. Penentuan Suhu Optimum Untuk Aktivitas Enzim Protease

Suhu optimum enzim diketahui melalui proses inkubasi enzim dengan variasi suhu yang berbeda yaitu  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$  dan  $70^{\circ}\text{C}$  pada pH optimum.

Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan mengikuti metode Bergmeyer dan Grassl (1983).

Suhu yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi menunjukkan suhu optimum.

**c. Pengujian Daya Hambat Inhibitor dan Berbagai Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease**

Senyawa penghambat yang digunakan adalah asam etilen diamintetraasetat (EDTA). Pengaruh ion logam pada aktivitas enzim diuji dengan mereaksikan enzim dengan  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , dan  $\text{FeCl}_3$  masing-masing konsentrasi 1mM dan 5 mM sebagai substrat enzim dengan kasein yang diinkubasi pada suhu optimum enzim selama 10 menit (Zilda, 2008).

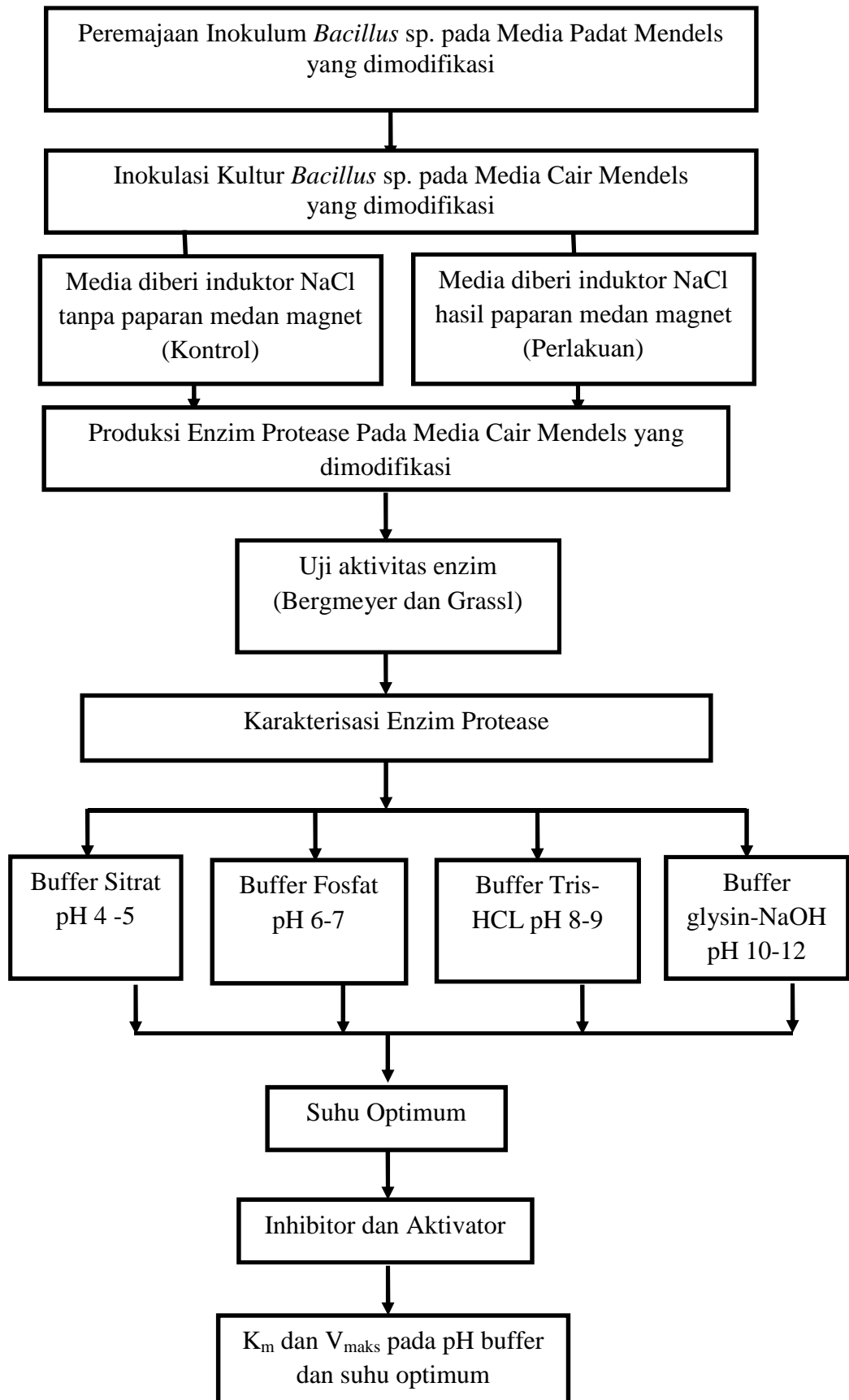
**d. Penentuan Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$**

Penentuan  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dilakukan dengan menguji aktivitas protease pada kondisi pH dan suhu optimum dengan variasi konsentrasi substrat kasein yaitu 0, 0.50, 1, 1.50, 2 dan 2.50%. Uji aktivitas protease dilakukan mengikuti metode Bergmeyer dan Grassl (1983). Data kecepatan ( $V$ ) terhadap konsentrasi substrat ( $S$ ) yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam persamaan Lineweaver-Burk. Nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  diperoleh dari nilai  $1/V_{maks}$  dan  $-1/K_m$  (Amin, 2008).

**D. Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

### E. Diagram Alir Penelitian



Gambar 7. Diagram alir penelitian

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### A. Simpulan

Enzim protease dari *Bacillus* sp. yang ditumbuhkan pada media Mendels dengan diinduksi NaCl yang dipapar medan magnet 0,2 mT selama 10 menit memiliki karakter sebagai berikut:

- a. pH optimum 6 dengan aktivitas protease sebesar 0,39 U/ml
- b. Suhu optimum 45°C dengan aktivitas protease sebesar 0,40 U/ml
- c. Inhibitor enzim protease yaitu EDTA, FeCl<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub> dan CaCl<sub>2</sub> serta aktivator enzim yaitu MgCl<sub>2</sub> dan CuSO<sub>4</sub> (1 mM).
- d. Nilai K<sub>m</sub> dan V<sub>maks</sub> yaitu 51,43 mM dan 2,34 U/ml.

### B. Saran

1. Produksi protease dari *Bacillus* sp. dapat ditingkatkan dengan penambahan NaCl yang dipaparkan medan magnet 0,2 mT selama 10 menit.

2. Perlu dilakukan uji produksi protease dari *Bacillus* sp. yang dipapar NaCl dengan lama pemaparan maupun besaran medan magnet yang berbeda untuk menghasilkan produksi protease dari *Bacillus* sp. yang maksimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abadi, P. 2005. Pengaruh Medan Magnet Terhadap Sudut Polarisasi Sinar Laser Pada Air dan Larutan NaCl (Influence of Magnetic Field Toward Polarization Angle Of Laser Ray To Water and NaCl Solution). *Seminar Tugas Akhir S1 Jurusan Fisika*. FMIPA UNDIP. Semarang
- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung
- Adinarayana K, Ellaiah, D.S Prasad. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11 AAPS. *Jurnal Pharm Sci Tech*. 4(4): 56-59.
- Alonso, M dan Finn. 1992. *Dasar-Dasar Fisika Universitas Jilid 2 Medan Magnet dan Gelombang Edisi ke 2*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Amin, F. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri Dalam Limbah Cair Tahu. *Jurnal Natur Indonesia*. 10(2): 83-88. FMIPA, Universitas Soedirman. Purwokerto.
- Anggrahini, Dian. 2016. Produksi, Pemekatan dan Karakterisasi Enzim Protease dari *Lactobacillus plantarum* SK (5), *Thesis*. Departemen MIK IPB. Bogor.
- Angraini, W. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Aktivitas Enzim – Amilase pada Kecambah Legum di Bawah Pengaruh Medan Magnet. *Skripsi*. FMIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Awaliatul, B. 2011. Studi Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa Dengan Sukrosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3. *Skripsi*. FMIPA Universitas Indonesia.
- Baehaki A, Suhartono, Palupi, Nurhayati . 2008. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 19(1): 80-87.
- Baehaki A, Rinto, Budiman . 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indralaya Sumatera Selatan. *Jurnal Teknol Industri Pangan*. 21: 40-45.



- Barrow, M.H. 1993. *Man And Movement Principles Of Physical Education. Physical Education-Its Philosophic Bases*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Beynon, Robert., dan Bond, Judith S. 2001. *Proteolityc Enzymes*. 2th ed. New York. Oxford University Press.
- Bergmeyer, H.V dan Grassl. 1983. *Menthods of Enzymatic Analysis. Vol II*. Verleg Chemi. Weinhein.
- Campbell, Mary K., Farell, Shawn O. 2006. *Biochemistry*. Ed ke-5. Weinheim (US): Yhomson Learning Inc.
- Campbell, Neil A., Reece, Jane B. 2008. *Biologi Edisi Kedelapan Jilid I*. Erlangga. Jakarta
- Campbell, Mary K., Farrell, Shawn O. 2013. *Biochemistry*. Ed ke-8. USA. Graphic World Inc.
- Chaplin, M.F. and C. Bucke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University. Press. Cambridge, Great Britain.
- Dewi, W. Kumala. 2006. Pemurnian dan Pencirian Protease dari Isolat Bakteri W-1 Yang Dihasilkan Oleh Tauco Hitam. *Skripsi*. Departemen Kimia. FMIPA IPB. Bogor.
- Edlin, Y.N., A. Agustine dan D.H. Tjong. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Alkali-Proteolitik Sumber Air Panas Semurup Kerinci Jambi. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 3(4): 303-309. FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Halliday, D and D. Resnick. 1999. *Fisika Dasar*. Erlangga. Jakarta.
- Hames and Hopper. 2000. *Biochemistry: The Instant Notes*. Ed.ke-2. Hongkong : Springer-Verlag.
- Hernawati, Wayan. 2015. Pengaruh Paparan Medan Magnet Pada Media Mendels Yang Dimodifikasi Terhadap Pertumbuhan Dan Aktivitas Enzim Selulase *Bacillus sp*. *Skripsi*. Jurusan Biologi, Universitas Lampung. Lampung.
- Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Miyamoto, H., dan Aizawa, K. 2003. Effects of ELF Magnetic Fields on Membrane Protein Structure of Living HeLa Cells Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Bioelectromagnetics* 24(7): 457-465
- Ishaq, M. 2007. *Fisika Dasar: Elektrisitas dan Magnetisme*. Graha Ilmu. Yogyakarta.

- Jewell, S.N. 2000. Purification and Characterization Of a Novel Protease from Burkholderia Strain 2.2 N. *Thesis*. The Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. Virginia.
- Kovacs, Phillip E., R.L. Valentine, dan Pedro J.J. Alvarez. 1997. The Effect of Static Magnetic Fields on Biological System: Implications for Enhanced Biodegradation. *Critical Reviews in Environment Science and Technology*. 27(4): 319-382
- Kurniawan, Muhammad. 2011. Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termoproteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Kabupaten Kerinci, Jambi. *Skripsi*. Universitas Jambi. Jambi.
- Lakshmi, B.K.M. 2014. Media Optimization of Protease Production by *Bacillus licheniformis* and Partial Characterization of Alkaline Protease. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(5): 650-659.
- Martins, M.L.L., Nascimento. 2006. Studies On Stability Of Protease From *Bacillus* sp. and Its Compability With Commercial Detergent. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 307-3011.
- Mira, R. A.A., dan N.Nasir. 2015. Pengaruh Faktor Abiotik terhadap Produksi Protease dari Isolat Bakteri M1-23. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 4(1): 45-49.
- Mittal, Dr. Aditya. 2007. *Microbial Physiology and Biochemistry*. Department of Biochemical Engineering & Biotechnology. Indian Institute of Technology. India.
- Madigan M.T., J.Martinko, J. Parker. 2003. *Borck Biology of Microorganisms*. 10<sup>th</sup> ed. Pearson Education, Inc. New York.
- Morejon, L.P., Palacio, J.C.Castro., Abad, Valazquez., Govea, AP. 2007. Stimulation of Pinus tropicalis M. Seeds by Magnetically Treated Water. *International Journal Agrophysics*, 21:173-177.
- Moat, Albert G., Foster, John W, dan Michael P. Spector. 2002. *Microbial Physiology*. 4<sup>th</sup> ed. Canada. A John Wiley & Sons Inc.
- Murray, R. K. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry 26<sup>th</sup> Edition*. USA. McGraw-Hill Companies.

- Nascimento WCA , MLL Martins. 2006. Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 307-3011.
- Nugroho, K. 1999. Produksi dan Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis* DB 104 Rekombinan Imobil Pada Media Limbah Cair Tahu. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. Bogor.
- Noha, M. 2014. *Purification and Biochemical Characterization of Halophilic, Alkalithermophilic Protease AbcP from Alkalibacillus* sp. NM-Fa4. Departement of Biochemistry, Suez Canal University. Egypt.
- Paada, Mohammad. 2004. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Protease Serin dari *Bacillus subtilis* Rekombinan R1. *Thesis*. Departemen Bioteknologi IPB. Bogor.
- Pelczar. M.J. dan E.C.S. Chan. 2005. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. UI Press.
- Poliana J, MacCabe AP. 2007. *Industrial Enzyme, Structure, Fuction, and Applications*. Springer, Dordrecht.
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, F.M. Titin. 2009. *Dasar-Dasar Biokimia*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pratiwi, Ajeng., Sumardi, R. Agustrina., dan B. Irawan. 2016. The Effect of Magnetic Field Exposure to Medium on Protease Production of *Bacillus* sp. In Qualitative Test. *The USR International Seminar on Food Security*. 1: 88
- Putri, Balqis Ananda. 2017. Influence of The Strenght Influence Of The Stenght And Duration Of Magnetic Field On Cell of *Bacillus* sp. Cell To The Activities Of Protease Enzyme. *International Conference on Applied Sciences Mathematics and Informatics*.
- Rahardhianto,A., Nurlita, dan Ninis. 2012. Pengaruh Konsentrasi Larutan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*) selama Masa Penyimpanan. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 1(1): 58-63 . Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).
- Rao, M.B., A.M, Tanksale, M.S. Gahtge and V.V. Despande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology Biology Review*. 62: 597- 635.

- Rohma, A. 2013. Pengaruh Medan Magnet Terhadap Aktivitas Enzim -Amilase Pada Kecambah Kacang Merah dan Kacang Buncis Hitam (*Phaseolus vulgaris* L.). *Prosiding Seminar Nasional Sains & Teknologi V*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung.
- Sandhya, D.Tambekar, and D Tambekar. 2013. Optimization of the production and partial characterization of an extracellular alkaline protease from thermo-halo-alkalophilic lonar lake bacteria. *Bioscience Discovery*. 4(1): 30-38.
- Saravanakumar K., Baskaran, T.R Kubendran. 2010. Acoustic and thermodynamic properties of binary liquid mixtures of acetophenone and benzene. *Jurnal Appl Sci*. 10: 1616-1621.
- Satiawihardja, Budiartman. 1997. Mempelajari Pengaruh Lingkungan Kimiawi Terhadap Aktivitas dan Daya Tahan Panas Protease dari *Bacillus pumilus* Y1. *Balai Teknologi dan Industri Pangan*. 8(2): 1-11.
- Setyasih, N. 2013. Pengaruh Medan Magnet 0,3 mT terhadap Stomata Daun Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill). Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Bandar Lampung
- Shahib, M.N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Simanjuntak, M.T. dan J. Silalahi. 2003. *Biokimia*. Farmasi FMIPA. Universitas Sumatera Utara.
- Soedigdo. 1988. Studi Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* sebagai biokatalis pada proses gliserolisis untuk menghasilkan momoasilgliserol, *Thesis*. Universitas Diponegoro.
- Soedjo, P. 2000. *Azas-Azas Ilmu Fisika*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Soeka, Y.Sudaryati dan Sulitiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis* A1 InaCC B398 Yang Diisolasi dari Terasi Samarinda. *Berita Biologi*. 13(2): 203-212. Puslit Biologi LIPI. Bogor
- Sumantha, G. Szakacs, dan A. Pandey. 2006. "Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation". *Process Biochem*. 40: 2689 – 2694.
- Sumardjo, D. 2006. *Pengantar Kimia*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia*. Cetakan Pertama. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

- Sutarma. 2000. *Kultur Media Bakteri*. Temu Teknis Fungsional non Peneliti. 52- 57.
- Thangam EB , Rajkumar GS. 2002. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *App Biochem*. 35: 144-154.
- Thontowi, Ahmad. 2001. Penambahan Mineral untuk Meningkatkan Aktivitas dan Stabilitas Fitase *Bacillus coagulans* E.1.4.4. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 6(1): 27-30. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor.
- Wardani, A. K. dan Lia O. N. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Hasil Isolasi dari Whey Tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 13(3): 149-156. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya Malang.
- Whitaker, J.R. 1996. *Enzymes*. In *Fennema O.R.* Fennema (ed). Food Chemistry. Third Edition. Marcell Dekker, Inc., New York and Basel.
- Whitman. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume three The Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg. New York.
- Wongsa, P., dan Werukhamkul, P. 2007. *Product Development and Technical Service*, Biosolution International. Thailand. Bengkadi Industrial Park..
- Yusriah dan Kuswytasari N. D. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(1): 48.
- Yusufa, M. H., M.C. Padaga, dan D.A. Octavianie. 2013. Identifikasi dan Studi Aktivitas Protease *Bacillus* sp. Asal Limbah Cair Rumah Potong Ayam Tradisional Sebagai Kandidat Penghasil Biodetergen. *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Dokter Hewan. Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Malang.
- Zilda, Dewi. S. 2008. Penapisan dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Termo-Asidofilik P5-a dari Sumber Air Panas Tambarana. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 7(3): 105-114.