

**PENENTUAN DATA KINETIKA DAN TERMODINAMIKA PROTEASE
ISOLAT BAKTERI INDIGEN TANAH BANDAR LAMPUNG**

(Skripsi)

Oleh

Indah Parwati



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

ABSTRACT

DETERMINATION OF KINETICS AND THERMODYNAMICS DATA of PROTEASE FROM INDIGENOUS SOIL BACTERIA - BANDAR LAMPUNG ISOLATE

By

INDAH PARWATI

Soil bacteria have great potential in producing protease enzymes. This research was aimed for determination the activity and characterization of protease enzymes from bacterial isolates isolated from soil in the Bandar Lampung area. Enzyme activity test was carried out quantitatively using the *Kunitz* method. Enzyme characterization included temperature, pH and optimum incubation, determination of K_M and V_{max} , and values of k_i , $t_{1/2}$ and ΔG_i . A bacterial isolate from soil was identified as *Klebsiella* sp. The optimum time for bacterial growth to produce proteases was 42 hours of incubation with protease activity of 0.719 U/mL. This protease enzyme has optimum pH at 7 with an activity value of 0.282 U/mL. The optimum temperature was 50 °C with an activity value of 0.783 U/mL and incubation time for 40 minutes with an activity value of 1.04 U/mL. The V_{max} was 0.6 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$ while the K_M was 6.1 mg/mL substrate. The values of k_i , $t_{1/2}$ and ΔG_i were 0.018 minute^{-1} , 37.7 minutes and 101.056 kJ/mol, respectively.

Keywords: protease. proteolytic bacteria, *Klebsiella* sp., characterization.

ABSTRAK

PENENTUAN DATA KINETIKA DAN TERMODINAMIKA PROTEASE ISOLAT BAKTERI INDIGEN TANAH BANDAR LAMPUNG

Oleh

INDAH PARWATI

Bakteri tanah mempunyai potensi besar dalam menghasilkan enzim protease. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas dan karakter enzim protease dari bakteri indigen tanah di kawasan Bandar Lampung. Pengujian aktivitas protease dilakukan secara kuantitatif dengan metode *Kunitz*. Karakterisasi enzim meliputi penentuan suhu, pH dan waktu inkubasi optimum, penentuan K_M dan V_{maks} , serta penentuan nilai k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i . Hasil penelitian menunjukkan bakteri indigen yang diperoleh merupakan *Klebsiella* sp. Waktu optimum pertumbuhan bakteri menghasilkan protease pada 42 jam inkubasi dengan aktivitas protease sebesar 0,719 U/mL. Enzim protease mempunyai kondisi optimum pada pH 7 dengan nilai aktivitas sebesar 0,282 U/mL, suhu optimum enzim protease yaitu pada suhu 50 °C dengan nilai aktivitas sebesar 0,783 U/mL dan waktu inkubasi optimum pada 40 menit dengan nilai aktivitas sebesar 1,04 U/mL. Nilai V_{maks} 0,6 $\mu\text{mol/mL}$ menit sedangkan nilai K_M sebesar 6,1 mg/mL substrat. Nilai k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i berturut-turut sebesar 0,018 menit^{-1} , 37,7 menit dan 101,056 kJ/mol.

Kata kunci: protease, bakteri proteolitik, *Klebsiella* sp., karakterisasi.

**PENENTUAN DATA KINETIKA DAN TERMODINAMIKA PROTEASE
ISOLAT BAKTERI INDIGEN TANAH BANDAR LAMPUNG**

Oleh

Indah Parwathi

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Penelitian : **PENENTUAN DATA KINETIKA DAN
TERMODINAMIKA PROTEASE ISOLAT
BAKTERI INDIGEN TANAH BANDAR
LAMPUNG**

Nama Mahasiswa : **Indah Parwati**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1757011015

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



1. Komisi Pembimbing

Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.
NIP. 197108062000032001

Mulyono, Ph.D.
NIP. 19740611200031002

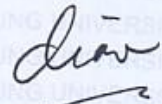
2. Ketua Jurusan Kimia

Mulyono, Ph.D.
NIP. 19740611200031002

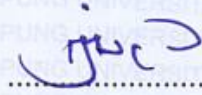
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



Sekretaris : **Mulyono, Ph.D.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Ir. Suharso, Ph.D.**



2. Dekan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 2 Maret 2022

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Indah Parwati
NPM : 1757011015
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Penentuan Data Kinetika dan Termodinamika Protease Isolat Bakteri Indigen Tanah Bandar Lampung”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya, selain itu tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya saya juga tidak keberatan apabila sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 31 Maret 2022

menyatakan,



Indah Parwati
NPM. 1757011015

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Indah Parwati, lahir di Bandar Lampung pada tanggal 08 November 1999. Penulis merupakan anak keempat dari empat bersaudara, pasangan Bapak Wiyadi dan Ibu Mulyanti.

Penulis mengawali pendidikan di Taman Kanak-Kanak Tamansiswa Teluk Betung yang diselesaikan pada tahun 2005. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Tamansiswa Teluk Betung pada tahun 2011, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 16 Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2011, dan melanjutkan pendidikan pada Sekolah Menengah Atas di SMAS YP UNILA Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2017. Pada tahun 2017, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Wilayah Barat Indonesia (SMM PTN-Barat).

Selama menempuh pendidikan, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan. Organisasi yang diikuti penulis yaitu Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) sebagai anggota Biro Usaha Mandiri (BUM) pada periode 2018 dan 2019. Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Kimia dan Biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2021.

Penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada tahun 2020 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Protease dari Lingkungan Tanah Tercemar Minyak”. Sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu kepada masyarakat, penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Juli-Agustus 2020 di Kelurahan Bumi Waras, Kecamatan Bumi Waras, Kota Bandar Lampung. Kemudian sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia kerja, penulis telah menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Data Kinetika dan Termodinamika Protease Isolat Bakteri Indigen Tanah Bandar Lampung”.

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Allah lah hendaknya kamu berharap.”
(QS. Al-Insyirah: 6-8)

“Ketahuilah bahwa kemenangan bersama kesabaran, kelapangan bersama kesempitan, dan kesulitan bersama kemudahan.”
(HR. Tirmidzi)

“Barang siapa yang tidak menyukuri yang sedikit, maka ia tidak akan mampu menyukuri sesuatu yang banyak.”
(HR. Ahmad)

“Life is like riding a bicycle. To keep your balance, you must keep moving.”
(Albert Einstein)

“The best way to get started is to quit talking and begin doing.”
(Walt Disney)

PERSEMBAHAN

الرَّحِيمِ حَمْنِ اللّٰهِ ————— مِسْ

“Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang”

Dengan segala rasa syukur, kupersembahkan karya ini kepada:

Kedua orang tuaku,
Bapak Wiyadi dan Ibu Mulyanti yang telah menghantarkan putrinya sampai tahap ini. Terima kasih banyak atas perjuangan, keringat, doa, motivasi, perhatian, dan kasih sayang yang tiada hentinya. Semoga karya kecil ini memberikan sedikit rasa bangga di hati kalian.

Dengan rasa hormat,
Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si., Bapak Mulyono, Ph.D., dan
Prof. Ir. Suharso, Ph.D.
Terimakasih atas segala bimbingan dan ilmu yang telah diberikan.

Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia
Atas dedikasi dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan di kampus.

Seluruh sahabat dan teman-temanku yang selalu hadir dan menyemangati penulis dalam keadaan suka maupun duka, mendengarkan segala keluhan kesah, dan berbagi keceriaan kepada penulis.

Serta
Almamater tercinta, Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT karena atas nikmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Penentuan Data Kinetika dan Termodinamika Protease Isolat Bakteri Indigen Tanah Bandar Lampung**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains di Universitas Lampung.

Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan, namun itu semua dapat penulis lalui berkat rahmat dan ridho Allah SWT serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, dengan rasa hormat dan tulus dari hati yang paling dalam, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku, Bapak Wiyadi dan Ibu Mulyanti yang telah melimpahkan kasih sayang dan do'a. Serta segala kesabaran, keikhlasan dan perjuangan untuk mendukung Penulis agar dapat sampai di titik ini. Semoga Allah senantiasa melindungi, serta memberikan kesehatan, umur yang panjang serta keberkahan didalamnya, dilancarkan rezekinya kepada Bapak dan Mama.
2. Kakak-kakakku Murdiyono, Andriyanto, Rahayu Sri Pamuji yang telah memberikan dukungan, bantuan dan semangat kepada Penulis.
3. Keponakan-keponakanku tersayang, Kanaya, Alya, Ibrahim, Hanif, Albiru dan Shanum yang selalu memberikan keceriaan dan semangat kepada penulis.
4. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si. selaku dosen Pembimbing I, yang selalu memberikan bimbingan, motivasi, motivasi, dan saran, serta meluangkan waktu, pikiran, tenaga dan kesabaran kepada Penulis selama proses penyelesaian skripsi ini. Semoga selalu diberikan kesehatan dan segala kebaikan Ibu dibalas oleh Allah.

5. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku dosen Pembimbing II yang sudah banyak membantu, meluangkan waktu dan memberikan pengarahan kepada Penulis dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi. Semoga selalu diberikan kesehatan dan segala kebaikan Bapak dibalas oleh Allah.
6. Bapak Prof. Ir. Suharso, Ph.D. selaku dosen Pembahas yang telah memberikan motivasi, kritik, dan saran yang membangun kepada Penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga selalu diberikan kesehatan dan segala kebaikan Bapak dibalas oleh Allah.
7. Ibu Prof. Buhani, M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah meluangkan waktu serta memberikan bimbingan, nasihat, dan saran kepada Penulis.
8. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
10. Bapak dan Ibu Dosen di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membimbing dan memberikan banyak ilmu, pengalaman, dan motivasi kepada Penulis selama perkuliahan. Semoga selalu diberi kesehatan.
11. Partner penelitianku “BDL 17”, Arifa Rahmatika Salsabilla, Firyal Humaira Arif, dan Grace Sondag Pretti. Terimakasih atas kerja sama, kesabaran, dorongan semangat, hiburan, kepedulian, kekompakkan, serta waktu yang diluangkan untuk mendengar keluh kesah Penulis. Semoga kita bisa sukses bersama dan bertemu kembali dikeadaan yang lebih baik dari saat ini.
12. Partner 24/7 ku, Sentausa Nuringjati yang selalu mendengarkan keluh kesah, menghibur dan memberikan semangat serta bantuannya sehingga Penulis dapat melewati masa-masa yang berat dalam perkuliahan dan penelitian.
13. Sahabat-sahabat penulis “Ternyata Kita Sepupu”, Alfinnisa Kamila, Fitri Puspitasari, Melati Pahjar Lestari dan Vivi Utami Dewi yang selalu menemani, memberikan dukungan, saran dan menghibur penulis dikala jenuh. Semoga persahabatan kita tetap terjaga.

14. Sahabat-sahabat terdekat penulis di kelas C, Aiga Sheira Rait, Anisa Amelz Widyani, Iffah Nur Faidah, Innama Trina, Najma Firdausi, Nelda Rosa Oktarida, Nikita Damayanti, Nurbaiti, Nurmalia Salis, Olivia Margareta D. S., Putri Okta Nadia, dan Windi Agustina serta teman-teman “Yuk Menuju Lebih Baik - Kelas C” yang selalu memberikan dukungan, saran, dan hiburan selama menjalani proses perkuliahan dan penelitian yang berat.
15. Sahabat-sahabat terdekat penulis, Aulia Putri Pramudita, Cani Diah Safitri dan Lalita Dewantari yang selalu memberikan dukungan, saran, dan hiburan selama menjalani proses perkuliahan dan penelitian yang berat. Semoga persahabatan kita tetap terjaga.
16. Teman-teman dan kakak-kakak di Laboratorium Biokimia atas bantuan, ilmu, kerja sama, dorongan semangat, serta pengalaman yang kalian bagi dengan Penulis.
17. Teman-teman “Kimia 2017” yang sudah menemani penulis sejak mahasiswa baru hingga penulis mampu menyelesaikan perkuliahan dengan baik. Semoga kita dapat dipertemukan kembali dan menjalani kehidupan yang baik.
18. *Last but not least, I wanna thank me for believing in me, for doing all this hard work, for having no days off, for never quitting, for just being me at all times.*

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, Oleh karena itu, Penulis memohon maaf atas segala kekurangan tersebut. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan informasi, wawasan, dan ilmu yang bermanfaat.

Bandar Lampung, 31 Maret 2022
Penulis,

Indah Parwati

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tanah.....	5
2.2. Bakteri.....	6
2.2.1. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri	6
2.2.2. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	7
2.3. Bakteri Proteolitik.....	8
2.4. Enzim Protease.....	9
2.4.1 Klasifikasi Protease	11
2.4.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	12
2.4.3. Uji Aktivitas Enzim Metode <i>Kunitz</i>	15
2.4.4. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	16
2.5. Pemurnian Enzim.....	16
2.5.1 Pengendapan Enzim Secara Bertahap dengan Menggunakan Ammonium Sulfat	17
2.5.2 Dialisis	18
2.5.3 Kromatografi Filtrasi Gel	19

2.6. Kinetika Enzim	20
2.7. Stabilitas Enzim	21
III. METODE PENELITIAN.....	24
3.1. Waktu dan Tempat	24
3.2. Alat dan Bahan.....	24
3.3. Prosedur Penelitian	25
3.3.1. Tahapan Persiapan	25
3.3.2. Isolasi Bakteri Proteolitik.....	26
3.3.3. Uji Aktivitas Proteolitik.....	27
3.3.4. Identifikasi Bakteri Proteolitik	27
3.3.5. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	27
3.3.6. Pengukuran Aktivitas Protease	28
3.3.7. Pengukuran Kadar Protein	28
3.3.8. Produksi Enzim Protease Ekstraseluler.....	28
3.3.9. Pemurnian Enzim	29
3.3.10. Karakterisasi Enzim Protease.....	31
3.3.11. Penentuan Kinetika Enzim (Nilai K_M dan V_{maks}).....	32
3.3.12. Penentuan Termodinamika Enzim	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1. Isolasi Bakteri Proteolitik	36
4.2. Uji Aktivitas Proteolitik.....	37
4.3. Identifikasi Bakteri.....	38
4.4. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri.....	39
4.4.1. Penentuan Waktu Optimum Pertumbuhan Bakteri	40
4.4.2. Penentuan pH Optimum Pertumbuhan Bakteri untuk Produksi Enzim Protease.....	41
4.5. Produksi Enzim Protease	42
4.6. Pemurnian Enzim Protease	42
4.6.1. Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat $[(NH_4)_2SO_4]$	43
4.6.2. Dialisis	44
4.6.3. Kromatografi Filtrasi Gel.....	45
4.7. Karakterisasi Enzim Protease Hasil Pemurnian.....	47

4.7.1. Penentuan pH Optimum.....	47
4.7.2. Penentuan Suhu Optimum	48
4.7.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum	49
4.8. Penentuan Nilai K_M dan V_{maks}	50
4.9. Penentuan Termodinamika Enzim.....	52
4.9.1. Penentuan Stabilitas Termal	52
4.9.2. Penentuan Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$) dan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i).....	52
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	55
5.1. Simpulan	55
5.2. Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data hasil isolasi bakteri proteolitik.....	37
2. Hasil uji biokimia <i>Klebsiella</i> sp.	39
3. Pemurnian enzim protease dari bakteri <i>Klebsiella</i> sp.	47
4. Hubungan nilai <i>optical density</i> (OD) dengan aktivitas enzim (U/mL)	64
5. Nilai aktivitas unit penentuan pH optimum untuk produksi enzim protease ...	64
6. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat pada berbagai fraksi dengan aktivitas enzim protease dari <i>Klebsiella</i> sp.	65
7. Hubungan antara tingkat kejenuhan amomonium sulfat fraksi (0-20)% dan (20-90)% dengan aktivitas enzim protease dari <i>Klebsiella</i> sp.	65
8. Nilai A280 enzim protease hasil kromatografi filtrasi gel	66
9. Hubungan profil fraksi dengan nilai aktivitas enzim protease hasil kromatografi	67
10. Pengaruh variasi PH pada aktivitas enzim protease hasil pemurnian	68
11. Pengaruh variasi suhu pada aktivitas enzim protease hasil pemurnian	68
12. Pengaruh variasi waktu inkubasi pada aktivitas enzim protease hasil pemurnian	68
13. Data untuk penentuan K_M dan V_{maks} enzim protease hasil pemurnuan berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk	69
14. Hubungan antara stabilitas termal erhadap aktivitas unit (U/mL) enzim protease hasil pemurnian	70
15. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim protease hasil pemurnian	70

16. Penentuan k_i (konstanta laju inaktivasi termal) enzim protease hasil pemurnian pada suhu 50 °C	71
17. Absorbansi tirosin pada berbagai konsentrasi	73
18. Absorbansi <i>Bovine Serum Albumin</i> pada berbagai konsentrasi	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva pertumbuhan bakteri.....	8
2. Hubungan aktivitas enzim dengan pH	13
3. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu.....	13
4. Hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat.....	14
5. Hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi enzim	15
6. Diagram Lineweaver-Burk.....	21
7. Skema proses fraksinasi enzim dengan amonium sulfat.....	30
8. Skema Penelitian.....	35
9. Hasil uji kualitatif zona bening	38
10. Pengaruh waktu produksi terhadap pertumbuhan bakteri dan aktivitas protease	40
11. pH optimum pertumbuhan bakteri <i>Klebsiella</i> sp. untuk produksi enzim protease	41
12. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat (%) terhadap aktifitas spesifik (U/mg) enzim protease.....	43
13. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat (%) terhadap aktifitas spesifik (U/mg) enzim protease pada fraksi (0-20)% dan (20-90)%.....	44
14. Profil hubungan A280 dengan nilai aktivitas enzim (U/mL) kromatografi filtrasi gel.....	46
15. Hubungan antara pH dengan aktivitas enzim protease hasil pemurnian.....	48
16. Hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim protease hasil pemurnian	49

17. Hubungan antara waktu inkubasi dengan aktivitas enzim protease hasil pemurnian.....	50
18. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian	51
19. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian.....	52
20. Hubungan $\ln (E_i/E_0)$ enzim protease hasil pemurnian	53
21. Hasil identifikasi bakteri.....	63
22. Kurva standar tirosin	73
23. Kurva standar BSA.....	74

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim adalah biokatalisator yang efektif untuk meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik secara nyata, tanpa enzim reaksi akan berlangsung lambat (Lehninger, 1995). Enzim memiliki beberapa sifat, yaitu sebagai katalisator yang efisien, selektif serta ekonomis, tidak beracun dan ramah lingkungan. Sehingga, enzim dapat dimanfaatkan dalam bidang industri, baik industri pangan maupun non pangan. Beberapa pengamatan yang telah dilakukan membuktikan bahwa penggunaan enzim meningkat dari tahun ke tahun mencapai 10-15% (Mufarikha dkk., 2014).

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Menurut Hodgson (1994), industri menggunakan enzim protease sekitar 30-35%, enzim amilase sekitar 10-12%, dan enzim lipase sekitar 2-3%. Perdagangan protease mencapai 60% dari total penjualan enzim dunia (Suhartono, 2000). Khususnya protease mikroba mencapai 40% dari total jumlah enzim yang di jual di dunia (Gupta et al., 2002). Kebutuhan enzim protease di Indonesia semakin meningkat, namun masih bergantung pada produk impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan tersebut dengan mengupayakan memproduksi enzim protease dengan memanfaatkan sumber daya hayati yang dimiliki Indonesia (Suhartono, 2000). Salah satu sumber daya yang dapat menghasilkan enzim protease adalah tanah.

Tanah adalah salah satu sumber daya yang berperan penting terhadap keberlangsungan hidup organisme. Tanah memiliki lima unsur utama yaitu air, mineral, gas, bahan organik, dan mikroba (Pelczar dan Chan, 1988). Berdasarkan

kandungan tanah tersebut, tanah dapat dijadikan sebagai salah satu sumber paling tepat untuk menapis mikroorganisme penghasil metabolit yang dapat dimanfaatkan oleh manusia. Kelompok utama dari mikroorganisme tanah meliputi bakteri (termasuk aktinomiset), cendawan, dan protozoa. Dari ketiga mikroorganisme tersebut bakteri merupakan mikroorganisme yang paling melimpah jumlahnya di dalam tanah. Bakteri tanah mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi. Potensi tersebut berhubungan dengan kemampuan yang dimilikinya seperti proteolitik (Vishwanatha *et al.* 2010).

Enzim protease dapat diperoleh dari tanaman, hewan dan mikroba. Seiring berjalannya waktu, pemanfaatan enzim dari hewan dan tanaman mulai digantikan oleh mikroorganisme (Nagodawithana and Reed, 1993). Pemilihan mikroorganisme sebagai sumber enzim disebabkan beberapa alasan yaitu bakteri lebih mudah tumbuh dengan kecepatan yang lebih cepat dibandingkan makhluk hidup lainnya, skala produksi enzim mudah ditingkatkan, biaya produksi enzim relatif rendah, kondisi produksi tidak tergantung pada musim dan waktu proses produksi enzim lebih pendek (Poernomo dan Purwanto, 2003).

Protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Proses hidrolisis dengan menggunakan enzim dapat berjalan dengan baik apabila menggunakan data kinetika yang tepat untuk mengendalikan produk yang dihasilkan. Kinetika reaksi digunakan dalam suatu mekanisme reaksi, yaitu bagaimana reaksi terjadi dan kecepatan terjadinya reaksi kimia. (Indra dan Retno, 2010). Data kinetika enzimatik dapat ditentukan nilai K_M dan V_{maks} suatu enzim, sehingga dapat dilakukan optimalisasi penggunaan enzim tersebut sebagai biokatalisator dalam reaksi pemecahan substrat menjadi produk. Hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatik dinyatakan sebagai K_M (tetapan Michaelis-Menten). Unsur kunci di dalam persamaan Michaelis-Menten adalah K_M , yang bersifat khas bagi enzim tertentu, dengan

substrat spesifik pada kondisi pH dan suhu tertentu. Nilai K_M kecil berarti enzim mempunyai afinitas tinggi terhadap substrat (Ratnayani dkk., 2015).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Sumardi dkk (2019) menunjukkan bahwa enzim protease dihasilkan pada waktu produksi optimum 18 jam dengan aktivitas protease sebesar 0,09 U/mL. Suhu optimum enzim ini yaitu pada suhu 50°C yang menghasilkan aktivitas sebesar 0,08 U/mL. Enzim protease ini mempunyai kondisi optimum pada pH 5 dengan nilai aktivitas 0,09 U/mL. Nilai V_{maks} enzim protease 0,33 U/mL sedangkan K_m senilai 4,59 mg/mL substrat. Penelitian Baehaki dkk., (2004) menunjukkan bahwa enzim protease yang dihasilkan dari *Klebsiella sp.* menunjukkan waktu optimum untuk produksi adalah 16 jam dengan aktivitas tertinggi sebesar 0,0389 IU/mL, pH optimum 7,5 – 8 dan suhu optimum 50°C.

Dari latar belakang di atas, sejalan dengan kemampuan enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri indigen untuk menghidrolisis ikatan peptida maka pada penelitian ini dilakukan karakterisasi protease untuk mengetahui kondisi optimum protease dari bakteri indigen asal tanah. Penentuan kondisi optimum meliputi: suhu, pH dan waktu inkubasi serta penentuan nilai K_M , V_{max} , dan penentuan nilai $t_{1/2}$, k_i dan ΔG_i .

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan bakteri indigen asal tanah yang memiliki aktivitas proteolitik.
2. Mempelajari kondisi optimum pertumbuhan bakteri asal tanah untuk produksi enzim protease.
3. Melakukan karakterisasi protease yang diperoleh dengan parameter suhu, pH dan waktu inkubasi.
4. Menentukan data kinetika meliputi K_M , V_{max} enzim protease dan data termodinamika meliputi $t_{1/2}$, k_i dan ΔG_i enzim protease.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu diharapkan memberikan informasi mengenai karakteristik enzim protease meliputi suhu, pH dan waktu inkubasi serta data kinetika dan termodinamika enzim protease yang diperoleh dari isolat lokal.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanah

Tanah dapat dipandang sebagai permukaan lahan di atas bumi yang menyediakan substrat bagi kehidupan tumbuh-tumbuhan dan hewan. Ciri-ciri lingkungan tanah bervariasi menurut letak dan iklimnya. Tanah juga memiliki kedalaman, sifat fisik, komposisi kimiawi dan asal yang berbeda. Tanah memiliki lima unsur utama yaitu air, mineral, gas, bahan organik, dan jasad hidup (Pelczar dan Chan, 1988). Berdasarkan kandungan tanah tersebut, tanah dapat dijadikan sebagai salah satu sumber paling tepat untuk menapis mikroorganisme penghasil metabolit yang dapat dimanfaatkan oleh manusia. Seperti antibiotik, enzim protease, enzim amilase, antitumor dan substansi bioaktif lainnya (Suwandi, 1993).

Kelompok utama dari mikroorganisme tanah meliputi bakteri (termasuk aktinomiset), cendawan, dan protozoa. Dari ketiga mikroorganisme tersebut bakteri merupakan mikroorganisme yang paling melimpah jumlahnya di dalam tanah. Tanah merupakan tempat hidup yang paling ideal bagi bakteri karena mengandung bahan organik, anorganik dan mineral yang berlimpah. Bakteri tanah mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi. Potensi tersebut berhubungan dengan kemampuan yang dimilikinya seperti proteolitik. Potensi ini dapat dimanfaatkan untuk industri pangan, minuman, obat-obatan dan penanganan limbah (Vishwanatha et al. 2010).

Berbagai faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dalam tanah adalah :

1. Jumlah dan macam zat hara
2. Kelembaban

3. Tingkatan
4. Suhu
5. pH
6. Perlakuan pada tanah seperti penambahan pupuk atau banjir menyebabkan peningkatan jumlah mikroorganisme (Lay dan Sugyo, 1992).

2.2. Bakteri

Bakteri adalah kelompok mikroorganisme bersel tunggal dengan konfigurasi selular prokariotik (tidak memiliki inti). Bakteri sebagai makhluk hidup memiliki informasi genetik berupa DNA tetapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. DNA pada bakteri berbentuk sirkuler, panjang dan biasa disebut nukleoid. DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun atas ekson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Jawetz *et al.*, 2004). Bakteri pada umumnya mempunyai ukuran sel 0,5-1,0 μm kali 2,0-5,0 μm , dan terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu bentuk bulat atau kokus, bentuk batang atau *Bacillus*, bentuk spiral (Dwidjoseputro, 1985).

2.2.1. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri menurut (Gaman, 1994) yaitu :

1. Waktu

Laju perbanyakan bakteri bervariasi menurut spesies dan kondisi pertumbuhan bakteri. Pada kondisi optimalnya hampir semua bakteri memperbanyak diri dengan cara pembelahan biner sekali setiap 20 menit.

2. Makanan

Semua mikroorganisme memerlukan nutrient yang di dalamnya menyediakan :

- a. Energi, biasanya diperoleh dari substansi mengandung karbon.
- b. Nitrogen untuk sintesis protein.
- c. Vitamin dan yang berkaitan dengan faktor pertumbuhan.

3. Kelembaban

Mikroorganisme sama halnya seperti organisme yang memerlukan air untuk mempertahankan hidupnya.

4. Suhu

Mikroorganisme dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok berdasarkan suhu pertumbuhannya.

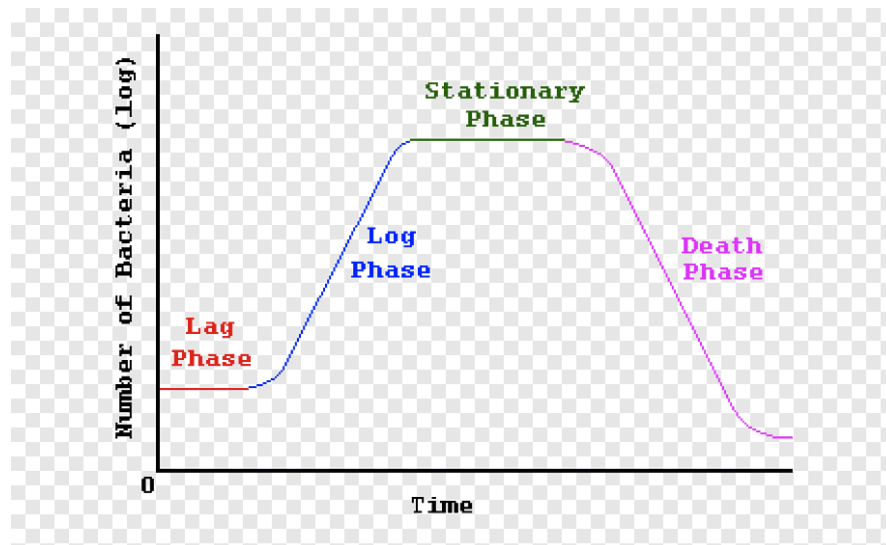
- a. Psikrofil (bakteri yang tumbuh pada suhu dingin) dapat tumbuh baik pada suhu dibawah 20 °C, kisaran suhu optimalnya adalah 10 °C sampai 20 °C.
- b. Mesofil (bakteri yang tumbuh pada suhu sedang) memiliki suhu pertumbuhan optimal antara 20 °C sampai 45 °C.
- c. Termofil (bakteri yang tumbuh pada suhu tinggi) dapat tumbuh baik pada suhu di atas 45 °C, kisaran pertumbuhan optimalnya adalah 50 °C sampai 60 °C.

5. Oksigen

6. pH

2.2.2. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri merupakan gambaran sejak awal hingga terhenti mengadakan kegiatan. Kurva ini terbagi ke dalam beberapa fase yaitu fase adaptasi (bakteri baru mulai menyesuaikan diri dengan lingkungannya), fase lag/pertumbuhan (bakteri mulai membela diri), fase tetap (jumlah sel yang mati sebanding jumlah sel yang hidup) dan fase kematian (sel mati karena kehabisan nutrien) (Fardiaz, 1989).



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri

2.3. Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Abraham *et al.*, 1993). Pada umumnya bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus*, *Staphylococcus* (Akmal dan Romita, 1996). Tingkat aktivitas proteolitik dapat dilihat dari keaktifan enzim dalam menghidrolisis protein. Aktivitas bakteri proteolitik dapat diketahui secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang UV 280 nm. Panjang gelombang tersebut dapat ditangkap dan dipantulkan kembali oleh asam amino suatu protein berdasarkan gugus aromatik terutama asam amino tirosin, triptofan dan fenilalanin (Walker and M. John, 2002). Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok (Rao *et al.*, 1998) :

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

Identifikasi morfologi bakteri penghasil protease dapat dilihat dengan cara mengisolasi bakteri menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). SMA

merupakan media yang terdiri dari NA steril dan susu skim. Susu skim digunakan sebagai sumber substrat. Selain itu susu skim juga mengandung protein tinggi sekitar 3,7% dan lemak 0,1%. Susu skim mengandung kasein yang dapat dipecah oleh mikroorganisme proteolitik menjadi senyawa nitrogen terlarut sehingga pada koloni dikelilingi area bening. Timbulnya zona bening dengan diameter ≥ 12 mm menandakan adanya bakteri protease yang dapat menghidrolisis protein.

2.4. Enzim Protease

Enzim merupakan biokatalisator yang sangat efektif yang akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik secara nyata, dimana reaksi ini tanpa enzim akan berlangsung lambat. Sifat-sifat istimewa enzim adalah kapasitas katalitik dan spesifisitasnya yang sangat tinggi (Lehninger, 1995). Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran lingkungan dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi, bersifat spesifik dan tidak beracun. Tiga sifat utama dari biokatalisator adalah menaikkan kecepatan reaksi, mempunyai kekhususan dalam reaksi dan produk serta kontrol kinetik (Akhdiya, 2003).

Protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein (Poliana, 2007). Protease merupakan kelompok enzim-enzim yang sangat kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersil. Protease ekstraseluler sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik intraseluler memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel hewan, tumbuhan dan mikroorganisme, seperti menggantikan protein, memelihara keseimbangan antara degradasi dan sintesis protein (Rao *et al.*, 1998).

Enzim protease dapat dihasilkan dari berbagai sumber, yaitu bakteri, jamur, virus, tumbuhan, hewan dan manusia. Protease yang dihasilkan dari berbagai bakteri kebanyakan bersifat basa dan netral, sedangkan protease yang dihasilkan oleh berbagai jamur dapat bersifat asam, netral, dan basa (Rao *et al.*, 1998). Enzim papain, bromelin dan fisin merupakan protease yang dihasilkan dari tanaman. Sedangkan tripsin, kemotripsin, pepsin, dan rennin merupakan protease yang berasal dari hewan. Kelemahan tanaman sebagai sumber protease adalah kesulitan untuk melakukan ekstraksi enzim efisien karena membutuhkan peralatan berat untuk menghancurkan jaringan tanaman yang besar dan keras (Lehninger, 1995). Selain itu, pertumbuhan tanaman terlalu lama untuk produksi enzim skala besar. Produksi protease dari hewan pun sangat terbatas, membutuhkan jumlah hewan dan biaya yang besar karena proses ekstraksi enzim dari jaringan hewan sulit untuk dilakukan. Enzim dari hewan paling banyak digunakan dalam industri pangan adalah kimosin, yaitu pada industri keju. Sedangkan enzim tanaman yang paling banyak digunakan dalam industri pangan adalah papain dan bromelin. Pada tahun 1950-1960, pemanfaatan enzim dari hewan dan tanaman mulai digantikan oleh enzim mikrobial (Nagodawithana and Reed, 1993).

Salah satu sumber penghasil enzim protease yang banyak diteliti adalah bakteri. Pemilihan bakteri sebagai sumber enzim protease disebabkan beberapa alasan yaitu:

1. Bakteri lebih mudah tumbuh dengan kecepatan yang lebih cepat dibandingkan makhluk hidup lainnya.
2. Skala produksi enzim mudah ditingkatkan.
3. Biaya produksi enzim relatif rendah.
4. Kondisi produksi tidak tergantung pada musim dan waktu proses produksi enzim lebih pendek (Poernomo dan Purwanto, 2003).

Beberapa jenis bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, dan *Serratia* merupakan penghasil enzim protease yang cukup potensial (Suhartono, 1989).

2.4.1 Klasifikasi Protease

Protease diklasifikasikan berdasarkan tiga kriteria utama, yaitu tipe reaksi yang dikatalisisnya, struktur kimia alami yang ada pada sisi katalitiknya, dan struktur yang berhubungan dengan evolusi (Rao *et al.*, 1998). Berdasarkan sistem klasifikasi IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), enzim-enzim proteolitik mikroba dapat dibedakan atas endopeptidase dan eksopeptidase. Eksopeptidase memecah substrat protein dari arah luar dan menghasilkan asam amino. Sedangkan endopeptidase yang memecah protein dari arah dalam akan menghasilkan polipeptida (Ward, 1993).

Berdasarkan cara kerjanya terhadap ujung N atau C terminal, eksopeptidase dapat dibedakan menjadi aminopeptidase (EC 3.4. 11), dipeptidase (EC 3.4. 13) dan karboksipeptidase (EC 3.4. 16 – EC 3.4. 17) (Ward, 1983). Endopeptidase terbagi menjadi 4 kelompok utama, yaitu protease serin (EC 3.4.21), protease sistein (EC 3.4. 22), protease aspartat (EC 3.4. 23) dan protease metal (EC 3.4. 24). Penamaan tersebut menunjukkan bagian penting dari sisi katalitik enzim.

1. Protease Serin

Protease serin adalah endopeptidase yang mempunyai residu sistein reaktif dan pH optimum mendekati netral. Protein serin mempunyai aktivitas maksimum pada pH alkalis. Tiga residu asam amino yang membentuk *catalytic triad* yang esensial pada proses katalitik, yaitu His57, Asp102 dan Serin195. Tahap pertama terjadi pembentukan intermediet asil-enzim antara substrat dan serin. Pada tahap kedua intermediet asil-enzim di hidrolisis dengan molekul air yang melepaskan peptida dengan gugus OH serin.

2. Protease Sistein

Famili protease ini meliputi protease tanaman seperti papain, aktinidin dan bromelain. Pada famili ini, papain merupakan tipe protease yang paling banyak dipelajari. Proses katalisis berlangsung melalui pembentukan intermediet kovalen yang melibatkan residu sistein dan histidin. Pada protease sistein, Cys25 dan His159 berperan sama seperti Ser195 dan His57 pada protease

serin. Ion thiolat lebih nukleofil daripada gugus OH. Ion thiolat distabilkan melalui pembentukan pasangan ion dengan gugus imidazolium dari His159.

3. Protease Aspartat

Protease aspartat umumnya mempunyai aktivitas katalitik maksimum pada pH asam. Hampir semua protease aspartat termasuk famili pepsin yang meliputi enzim digestif seperti pepsin, chimosin, rennin dan protease fungal.

Enzim yang pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil, keaktifannya dapat dihambat oleh p-bromo fenasilbromida (Hartley, 1960).

4. Protease Metal

Protease metal mengandung ion logam esensial, biasanya Zn yang mempunyai aktivitas optimum didekat pH netral. Enzim ini distabilkan oleh Ca^{2+} dan dihambat oleh bahan pengkelat yang kuat seperti EDTA. Enzim ini umumnya terdapat dalam mikroorganisme (Nagodawithana and Reed, 1993).

2.4.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

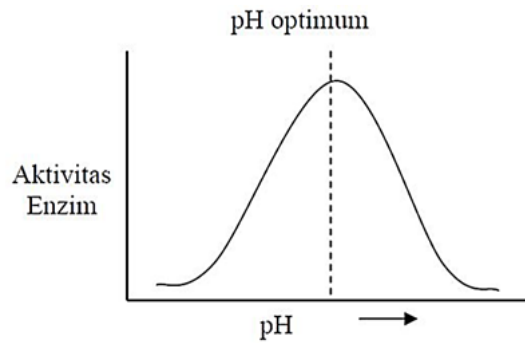
Enzim sebagai biokatalisator berstruktur protein, dalam mekanisme kerja aktivitasnya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, pH, suhu, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, kehadiran aktivator atau inhibitor (Poedjadi dan Supriyanti, 1994).

1. pH

pH merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan apabila bekerja dengan enzim, hal ini dikarenakan enzim hanya mampu bekerja pada kondisi pH tertentu saja. Suatu kondisi pH dimana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum.

Sebaliknya pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak.

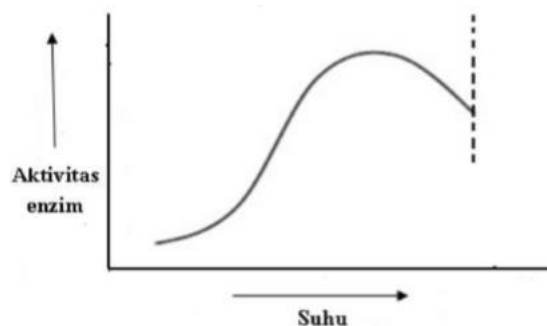
Hubungan antara pengaruh pH terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva pada Gambar 2.2 :



Gambar 2. Hubungan aktivitas enzim dengan pH

2. Suhu

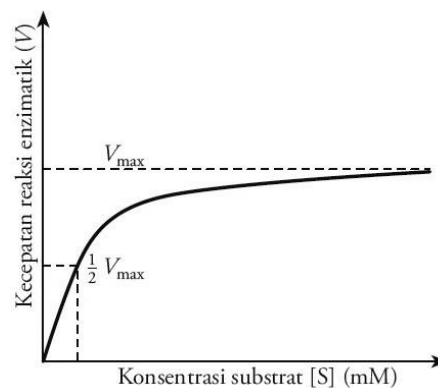
Sama seperti reaksi kimia, suhu biasanya dapat mempercepat proses reaksi, namun demikian pada titik suhu tertentu kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan mulai menurun bahkan aktivitasnya tidak lagi nampak. Kondisi suhu dimana enzim dapat menghasilkan aktivitas tertinggi dinamakan suhu atau temperatur optimum. Karena enzim berstruktur protein, sebagaimana diketahui bahwa protein dapat dirusak oleh panas, sehingga pada suhu tinggi tertentu aktivitas enzim mulai menurun bahkan aktivitasnya bisa saja menghilang. Hal ini sangat dimungkinkan karena terjadinya denaturasi atau kerusakan struktur enzim yang dapat menyebabkan kerusakan enzim baik secara keseluruhan maupun sebagian terutama sisi aktifnya. Hubungan antara pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva pada Gambar 2.3 :



Gambar 3. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu

3. Konsentrasi Substrat

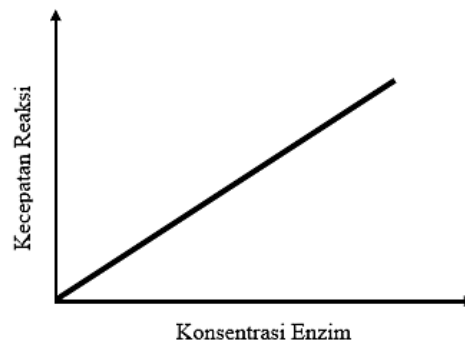
Jika melakukan pengujian konsentrasi substrat dari rendah ke tinggi terhadap kecepatan reaksi enzimatik, maka pada awalnya akan diperoleh hubungan kesebandingan yang menyatakan kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, namun kemudian akan diperoleh data yang menyatakan pada konsentrasi substrat tinggi tertentu kecepatan reaksi tidak lagi bertambah. Pada kondisi ini konsentrasi substrat menjadi jenuh dan kecepatan reaksi menjadi maksimum yang sering juga disebut sebagai kecepatan maksimum (V_{\max}). Hubungan antara pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva pada Gambar 2.4 :



Gambar 4. Hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat

4. Konsentrasi Enzim

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Hubungan antara pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva pada Gambar 2.5 :



Gambar 5. Hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi enzim

5. Kofaktor

Aktivitas katalitik enzim dapat dipengaruhi oleh aktivator (bahan-bahan yang meningkatkan aktivitas enzim) dan inhibitor (bahan-bahan yang menurunkan aktivitas enzim). Berdasarkan kinetiknya, inhibitor dapat dibedakan menjadi inhibitor ireversibel dan reversibel (Palmer, 1995).

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh kofaktor, yaitu komponen non protein dari enzim yang menentukan aktivitas katalitiknya. Kofaktor ini dapat berupa senyawa organik yang disebut koenzim atau senyawa non organik seperti ion logam Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} dan Ca^{2+} (Lehninger, 1995). Ion-ion logam ini umumnya ditambahkan dalam bentuk garam, misalnya ion Ca^{2+} dalam bentuk garam klorida. Kation-kation lain yang telah diketahui dapat mengaktifkan enzim adalah Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , dan Al^{3+} (Palmer, 1995).

2.4.3. Uji Aktivitas Enzim Metode *Kunitz*

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim protease yaitu metode *Kunitz*. Prinsip pengujiannya berdasarkan pada kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis kasein. Residu kasein yang tidak terhidrolisis akan diendapkan oleh Tri *Chloroacetic Acid* (TCA). Penambahan TCA ini berfungsi untuk menginaktifkan enzim protease. Kemudian endapan dipisahkan dan fitratnya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 280 nm (*Kunitz*, 1947 dalam Novitasari dkk., 2014).

2.4.4. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Penentuan kadar protein dengan metode Lowry bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada setiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang baik. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada ion Cu (II) yang bereaksi dengan ikatan peptida pada protein (enzim) akan membentuk senyawa kompleks. Selanjutnya, kompleks Cu²⁺ akan tereduksi menjadi Cu⁺ pada kondisi basa. Kemudian, Cu⁺ yang terikat pada rantai samping tirosin, triptofan dan sistein dari protein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocalteu's*. Ketika reagen *folin-ciocalteu's* ditambahkan, maka reagen akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen dan mengubah warna kuning menjadi biru. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosin pada protein (Lowry *et al.*, 1951).

2.5. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim merupakan suatu upaya yang dilakukan untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas spesifik lebih baik daripada ekstrak kasarnya dan menghasilkan yield enzim yang tinggi. Proses pemurnian enzim melalui 2 tahapan besar, yakni pemurnian dalam jumlah besar dan pemurnian dalam jumlah kecil. Beberapa teknik yang umumnya digunakan antara lain dengan memanfaatkan pH atau suhu ekstrim, partisi fase dengan pelarut organik, penambahan bubuk resin ion exchange, maupun dengan teknik *salting out*. Metode pemurnian enzim dapat dipilih berdasarkan sifat enzim tersebut sebagai protein yang memiliki perbedaan dari segi kelarutan, muatan, serta ukurannya (Lehninger, 1995). Hasil yang diharapkan dari proses pemurnian enzim ini ialah didapatkan *yield* maksimal dari enzim yang diisolasi, dan kenaikan aktivitas spesifik serta *purification factor*-nya.

2.5.1 Pengendapan Enzim Secara Bertahap dengan Menggunakan Ammonium Sulfat

Metode yang umum digunakan untuk pemurnian enzim yakni dengan prinsip *salting out* menggunakan amonium sulfat yang biasa digunakan untuk purifikasi protein (Matthews *et al.*, 1997). Garam amonium sulfat sering digunakan dalam proses pemurnian karena sifatnya yang sangat larut, murah, dan memiliki tingkat pemurnian tertinggi serta tidak mengubah pH larutan protein sampel menjadi ekstrim yang dapat mengakibatkan denaturasi protein. Proses ini menggunakan kadar garam tinggi untuk mengendapkan protein, dimana kelarutan protein akan menurun apabila berada pada kondisi tersebut.

Prinsip *salting out* didasari oleh kompetisi antara ion garam dan molekul protein untuk berikatan dengan air. Oleh sebab itu, pada konsentrasi garam yang tinggi, air akan cenderung terikat dengan garam dibandingkan dengan molekul protein. Konsentrasi garam yang ditambahkan ke dalam ekstrak kasar enzim dibuat variatif dan dilakukan pada suhu rendah (Sorensen *et al.*, 1999). Kondisi suhu rendah mampu meningkatkan presipitasi protein saat penambahan garam kadar tinggi. Semakin tinggi konsentrasi garam tersebut, kelarutan protein akan semakin rendah sehingga protein akan mengendap. Penambahan garam secara terus menerus secara perlahan akan menaikkan konsentrasi garam dalam larutan. Garam memiliki derajat ionisasi yang lebih tinggi daripada protein, sehingga garam memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap air yang mengelilingi protein. Akibatnya, terjadi kompetisi antara garam dan protein untuk mempertahankan molekul air. Namun, semakin tinggi konsentrasi garam, kepolaran protein tidak mampu menyaingi kepolaran garam sehingga molekul air akan lebih tertarik pada garam. Akibatnya, molekul air tidak lagi melindungi protein dan asam amino hidrofobik akan semakin muncul ke permukaan.

Beberapa keuntungan apabila menggunakan metode pengendapan menggunakan amonium sulfat yaitu dapat mengendapkan hampir seluruh protein karena amonium sulfat memiliki molaritas yang besar, memiliki densitas rendah yakni $1,235 \text{ g.cm}^{-3}$ sehingga tidak akan ikut terendapkan saat sentrifugasi protein, serta

pada proses pelarutan akan menghasilkan panas pelarutan yang rendah sehingga protein tidak terdenaturasi (Scopes, 1993).

2.5.2 Dialisis

Dialisis merupakan metode yang umumnya digunakan untuk meningkatkan kemurnian suatu molekul dalam tahap purifikasi. Dialisis adalah proses perpindahan molekul terlarut dari suatu campuran larutan yang terjadi akibat difusi pada membran semi-permeabel. Molekul terlarut yang berukuran lebih kecil dari pori-pori membran akan keluar, sedangkan molekul lainnya yang lebih besar akan tertahan di dalam selubung membran. Pemisahan ini perlu dilakukan agar garam-garam anorganik tidak mengganggu tahap pemurnian enzim selanjutnya.

Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan tabung selofan yang memiliki ukuran pori-pori lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari tabung selofan. Pemanfaatan tabung selofan memiliki beberapa keuntungan antara lain mudah digunakan, harganya relatif murah dan mudah diperoleh. Laju difusi ditentukan oleh beberapa kondisi antara lain yaitu konsentrasi molekul pelarut yang akan keluar dari membran dialisis, luas permukaan membran dialisis, dan volume pelarut yang digunakan. *Buffer* digunakan saat dialisis untuk melarutkan senyawa non protein, selain itu *buffer* berfungsi menjaga kestabilan pH enzim, karena perubahan pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim dan pH yang ekstrim dapat merusak enzim. Efektivitas *buffer* dipengaruhi oleh konsentrasi dan bahan penyusun *buffer*.

Tabung dialisis memiliki pori berukuran tertentu, sehingga molekul berukuran kecil akan dapat melalui pori sedangkan molekul berukuran besar tidak dapat melewatinya (Scopes, 1993). Molekul berukuran kecil biasanya merupakan pengotor seperti sisa garam, sedangkan molekul berukuran besar yang dimaksud ialah protein.

2.5.3 Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi filtrasi gel merupakan teknik pemisahan protein dan makromolekul biologi lain berdasarkan ukuran molekul. Kromatografi filtrasi gel merupakan suatu proses pemisahan protein berdasarkan perbedaan ukuran molekul dari suatu protein. Proses pemisahan menggunakan matriks gel berpori yang ditempatkan di dalam kolom dan dikelilingi oleh pelarut. Teknik kromatografi filtrasi gel bekerja dengan prinsip pemisahan berdasarkan ukuran molekul zat padat (Lehninger, 1982).

Mekanisme pemisahan yang terjadi adalah adsorpsi. Pada kromatografi filtrasi gel yang terjadi berdasarkan ukuran molekul dari senyawa-senyawa dalam campuran. Fasa diam pada kromatografi ini dibuat dengan ukuran pori tertentu dan seragam. Senyawa-senyawa yang mempunyai ukuran lebih kecil atau mirip dengan pori pada permukaan fasa diam akan diretensi. Dengan demikian, molekul-molekul yang lebih besar dielusi terlebih dahulu dan molekul-molekul yang lebih kecil dielusi kemudian. Fase gerak yang digunakan berupa suatu pelarut yang hanya berfungsi untuk melarutkan analit (senyawa yang diinginkan). Jadi dalam kromatografi jenis ini tidak terjadi interaksi antara fasa gerak dengan fasa diam dan senyawa-senyawa dalam campuran. Fasa gerak hanya berfungsi sebagai pembawa (*carrier*) (Leba, 2017).

Matriks filtrasi gel berupa gel yang berpori seperti dekstran, agarosa atau poliakrilamida. Contoh matriks komersial tersebut adalah *sepharose*, *sephadex*, dan *biogel*. Ada beberapa tipe gel yang digunakan dalam eksperimen biokimia, yang utama adalah gel *sephadex*. Gel *sephadex* merupakan suatu bahan yang tidak larut dan stabil dalam air, larutan garam, larutan organi, serta tidak terpengaruh oleh basa dan asam lemah (Bintang, 2010). Gel atau matriks berpori kemudian dikemas di dalam kolom dan dielusi dengan fase cair. Pori-pori matriks dapat menampung molekul berukuran lebih kecil. Molekul berukuran lebih kecil akan memasuki pori-pori matriks, namun molekul yang besar tidak terperangkap ke dalam pori kolom. Hasil yang dicapai adalah molekul besar akan keluar dari kolom lebih dulu dibanding molekul yang lebih kecil (Scopes, 1993).

2.6. Kinetika Enzim

Parameter dalam kinetika reaksi enzim adalah konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan laju reaksi maksimum (V_{max}). Berdasarkan postulat Michaelis dan Menten pada suatu reaksi enzimatik terdiri dari beberapa fase yaitu pembentukan kompleks enzim substrat (ES), dimana E adalah enzim dan S adalah substrat, modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim (EP) dan pelepasan produk dari molekul enzim (Shahib, 2005). Setiap enzim memiliki sifat dan karakteristik yang spesifik seperti yang ditunjukkan pada sifat spesifisitas interaksi enzim terhadap substrat yang dinyatakan dengan nilai tetapan Michaelis-Menten (K_m).

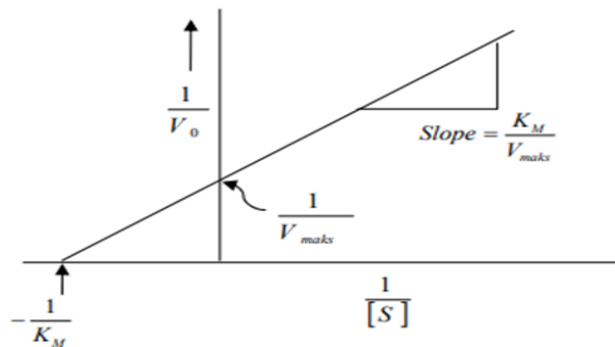
Nilai K_m didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan setengah kecepatan maksimum. Setiap enzim memiliki nilai K_m dan V_{max} yang khas dengan substrat spesifik pada suhu dan pH tertentu (Kamelia *et al.*, 2005). Nilai K_m yang kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-substrat sangat mantap dengan afinitas tinggi terhadap substrat, sedangkan jika nilai K_m suatu enzim besar maka enzim tersebut memiliki afinitas rendah terhadap substrat (Page, 1997). Nilai K_m suatu enzim dapat dihitung dengan persamaan Lineweaver-Burk yang diperoleh dari persamaan Michaelis-Menten yang kemudian dihasilkan suatu diagram Lineweaver-Burk yang ditunjukkan pada Gambar 6 :

Nilai K_M enzim sangat bervariasi, untuk sebagian besar enzim K_M terletak antara 10^{-1} sampai 10^{-7} M. Nilai K_M untuk suatu enzim tergantung pada substrat tertentu dan pada kondisi lingkungan seperti pH, suhu dan kekuatan ion (Stryer *et al.*, 2002).

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \longrightarrow \boxed{\text{Persamaan Michaelis-Menten}}$$

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

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \longrightarrow \boxed{\text{Persamaan Lineweaver-Burk}}$$



Gambar 6. Diagram Lineweaver-Burk

2.7. Stabilitas Enzim

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam, basa) dan oleh pengaruh temperatur dan pH ekstrim (Kazan *et al.*, 1997). Beberapa enzim tidak stabil dan mudah terdenaturasi, sehingga aktifitas enzimnya hilang. Setiap enzim mempunyai suhu dan pH optimum untuk aktivitasnya. Dalam melakukan aktivitasnya, enzim dipengaruhi oleh lingkungannya. Pengaruh tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim sehingga menjadi masalah yang sering dihadapi dalam industri.

Stabilitas merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis. Ada dua cara yang dapat digunakan untuk memperoleh enzim dengan stabilitas yang tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil. Peningkatan stabilitas enzim dapat

dilakukan dengan menggunakan zat aditif, modifikasi kimia dan rekayasa protein (Illanes, 1999).

Selain itu, untuk mempelajari kestabilan suatu enzim dapat dilakukan dengan menentukan waktu paruh ($t_{1/2}$) dan data termodinamika lain yang berhubungan dengan kestabilan, yaitu konstanta laju inaktivasi (k_i) dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) (Kazan *et al.*, 1997).

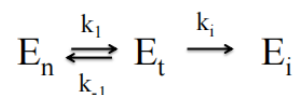
1. Waktu Paruh ($t_{1/2}$)

Waktu paruh ($t_{1/2}$) adalah waktu dimana enzim kehilangan setengah aktivitasnya setelah meluruhkan substrat hingga konsentrasinya menjadi setengah konsentrasi awal (Baysal *et al.*, 2014). Waktu paruh dapat dihitung dari persamaan laju reaksi orde satu (Kazan *et al.*, 1997), seperti berikut:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} = \frac{0,693}{k_i} \dots\dots\dots(1)$$

2. Konstanta Laju Inaktivasi (k_i)

Mekanisme inaktivasi *irreversible* enzim berlangsung seperti berikut:



Persamaan regresi linier dari laju inaktivasi enzim orde satu antara aktivitas sisa enzim pada t_0 ($[E]_0$) dan aktivitas sisa enzim yang terinaktivasi pada t_i ($[E]_i$) (Kazan *et al.*, 1997), adalah sebagai berikut:

$$\ln\left(\frac{E_i}{E_0}\right) = -k_i t \dots\dots\dots(2)$$

3. Uji Stabilitas Termal Enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa (%) enzim setelah diinkubasi selama 0; 10; 20; 30; 40; 50 dan 60 menit pada suhu optimum (Yang *et al.*, 1996).

$$\text{Aktivitas sisa (\%)} = \frac{E_i}{E_0} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

Kemudian data aktivitas sisa enzim pada t_0 ($[E]_0$) dan aktivitas sisa enzim yang terinaktivasi pada t_i ($[E]_i$) dibuat grafik linier. Data ini digunakan untuk menentukan nilai k_i .

4. Perubahan Energi Bebas Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Energi bebas akibat denaturasi (G_i) adalah energi bebas yang dibutuhkan untuk mendenaturasi enzim dari keadaan awal. Penentuan nilai ΔG_i diturunkan dari persamaan termodinamika berikut:

$$\Delta G_i = -R T \ln \left(\frac{k_i h}{k_B T} \right) \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan : R = Konstanta gas ($8,315 \text{ J.K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = Suhu absolut (K)

k_i = Konstanta laju inaktivasi termal

H = Konstanta Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J det}$)

k_B = Konstanta Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

(Kazan *et al.*, 1997)

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2021 sampai November 2021 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Pengambilan sampel dilakukan di lingkungan tempat penjual nasi goreng, Kedaton, Bandar Lampung. Identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Balai Veteriner Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, *autoclave*, oven, *Laminar Air Flow* (LAF), pipet tetes, *hot plate*, batang pengaduk, *beaker glass*, inkubator, gelas ukur, bunsen, spatula, neraca analitik, jarum ose, pH meter, *water bath*, spektrofotometer *UV-Vis*, *shaker incubator*, kolom *sephadex G-75* dan alat sentrifugasi.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah, *Nutrient Agar* (NA), akuades, *skim milk*, NaCl, Na₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, Na(K)-tartarat, reagen Folin-Ciocalteu, NaOH, tirosin, *buffer* fosfat pH 7,0, alkohol 95%, ammonium sulfat, gel *sephadex G-75*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Tri Chloroacetic Acid* (TCA)

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahapan Persiapan

a. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanah dilakukan di kawasan Kampung Baru, Rajabasa, Bandar Lampung. Permukaan tanah digali dengan menggunakan sendok, setelah itu sampel tanah dimasukkan ke dalam botol yang telah disterilkan.

b. Pembuatan Larutan Fisiologis

Bubuk NaCl ditimbang sebanyak 0,85 g menggunakan neraca analitik lalu dilarutkan dengan 100 mL akuades kemudian ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil. Larutan tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Larutan ini digunakan sebagai larutan pengencer sampel tanah yang akan digunakan.

c. Persiapan Alat

Semua peralatan gelas yang akan dipakai dicuci bersih, dikeringkan dan disterilisasi agar alat-alat tersebut terhindar dari mikroba yang tidak diinginkan. Sterilisasi alat dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Alat-alat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam oven selama kurang lebih 2 jam.

d. Pembuatan Media Selektif

Media padat yang digunakan yaitu medium *Skim Milk Agar* (SMA) untuk media pertumbuhan bakteri. Medium SMA dibuat dengan menimbang 2,8 gram *Nutrient Agar* (NA) dan 1 gram *skim milk* kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

e. Pembuatan Media Produksi Protease

Media produksi protease dibuat dengan 10% *skim milk* yang dilarutkan

dalam 1000 mL *buffer* fosfat, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

f. Pembuatan Pereaksi

Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan Metode *Kunitz*.

Pereaksi yang digunakan, yaitu :

1. Larutan Kasein : Sebanyak 1 g kasein dilarutkan dalam 100 mL *buffer* fosfat pH 7.
2. Larutan TCA : Sebanyak 5 g TCA dilarutkan dalam 100 mL akuades.
3. Larutan standar : Larutan tirosin.

Penentuan kadar protein ekstrak kasar enzim protease dilakukan dengan menggunakan Metode Lowry. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi Lowry. Pereaksi Lowry terdiri atas 4 macam, yaitu:

1. Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
2. Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (w/v) ditambahkan 5 mL larutan Na(K)-tartarat 1% (w/v).
3. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.
4. Pereaksi D : reagen Folin-Ciocalteu diencerkan dengan akuades 1:1.
5. Larutan standar : Larutan BSA (Bovine Serum Albumin)

3.3.2. Isolasi Bakteri Proteolitik

Sebanyak 1 g sampel tanah dimasukkan ke dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan larutan fisiologis (NaCl 0,85% (w/v)) sebanyak 100 mL lalu di *vortex* selama 1 menit. Kemudian sampel disaring, diambil larutannya dan dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-6} . Setelah itu diambil 1 mL hasil pengenceran kemudian diinokulasikan dalam media *Skim Milk Agar* dengan metode *pour plate* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam pada suhu 37 °C. Koloni yang tumbuh pada cawan petri kemudian dimurnikan pada media *Skim Milk Agar* dengan metode *spread*.

3.3.3. Uji Aktivitas Proteolitik

Isolat diremajakan pada media *skim milk* selama 24 jam pada 37 °C. Uji kualitatif aktivitas enzim protease dilakukan dengan cara ditetesi isolat pada media *Skim Milk Agar* yang di atasnya sudah diletakkan kertas cakram. Uji positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri pada permukaan media SMA.

3.3.4. Identifikasi Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri penghasil protease yang berhasil diisolasi dan memiliki aktivitas proteolitik dikirim ke Laboratorium Bakteriologi Balai Veteriner Lampung untuk diidentifikasi. Identifikasi bakteri dilakukan melalui serangkaian uji biokimia.

3.3.5. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Sebelum produksi enzim protease, terlebih dahulu dilakukan penentuan kondisi optimum bakteri penghasil enzim protease. Media yang digunakan adalah media *skim milk*. Media *skim milk* diberikan kondisi lingkungan yang bervariasi, yaitu dengan memvariasikan pH dan waktu inkubasi. Variasi pH yang dilakukan adalah 6, 7 dan 8. Untuk variasi waktu inkubasi yang dilakukan adalah 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 dan 72 jam.

Proses ini dimulai dengan pembuatan inokulum kemudian dilanjutkan dengan proses fermentasi (produksi enzim). Bakteri diinokulasi sebanyak 1-2 ose pada media *skim milk* yang dilarutkan dalam *buffer* fosfat dan disimpan dalam shaker inkubator. Inokulum yang telah diinkubasi selama 24 jam pada 115 rpm diambil sebanyak 10% untuk diinokulasikan ke dalam 100 mL medium produksi. Setiap 6 jam sampling dilakukan untuk pengukuran pertumbuhan mikroba yang dikenal dengan pengukuran *optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm.

3.3.6. Pengukuran Aktivitas Protease

Aktivitas protease diukur dengan metode *Kunitz*. Pada sampel, sebanyak 1 mL substrat kasein (dalam *buffer* fosfat pH 7) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan sebanyak 1 mL larutan enzim ke dalam substrat. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 mL larutan TCA dalam keadaan dingin. Campuran uji dibiarkan mengendap selama 30 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit.

Pada kontrol, sebanyak 1 mL larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 mL larutan TCA. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit, setelah itu ditambahkan sebanyak 1 mL larutan kasein. Campuran uji dibiarkan mengendap selama 30 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit.

Kemudian filtrat diukur dengan Spektrovotometer UV-Vis pada $\lambda = 280$ nm. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah asam amino (peptida sederhana) yang terbentuk dengan menggunakan kurva standar tirosin. Digunakan standar tirosin karena sebagian besar protein mengandung tirosin.

3.3.7. Pengukuran Kadar Protein

Kadar protein dalam media kultur diukur berdasarkan metode Lowry. Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan 0,9 mL aquades dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 mL pereaksi C. Kemudian dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan pereaksi D sebanyak 0,3 mL lalu dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Serapannya diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan kadar protein enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

3.3.8. Produksi Enzim Protease Ekstraseluler

Setelah diketahui kondisi optimum produksi enzim, dilakukan produksi enzim dalam jumlah (volume) besar sekitar 1.000 mL pada kondisi optimum. Media

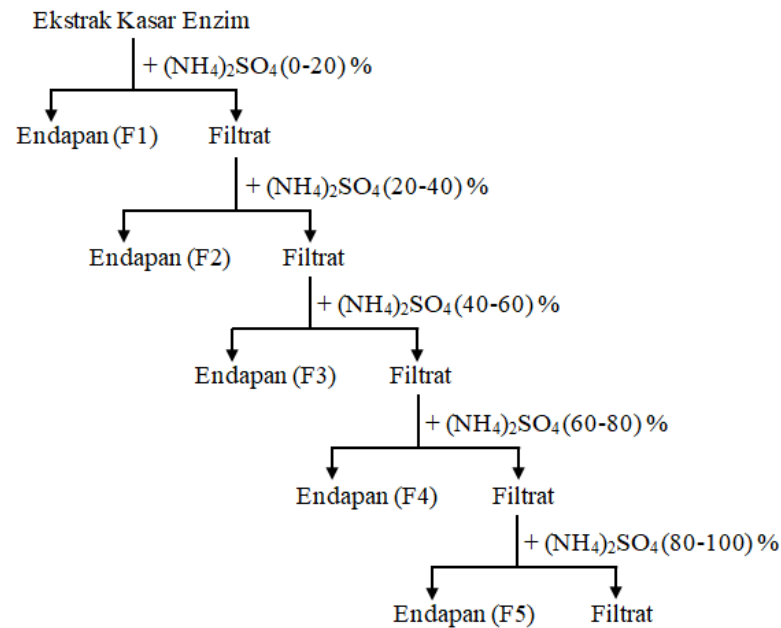
produksi atau fermentasi selanjutnya diinkubasi selama kondisi produksi optimum. Kemudian media fermentasi disentrifugasi selama 20 menit. Ekstrak kasar enzim diukur aktivitasnya dengan metode *Kunitz* dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.9. Pemurnian Enzim

a. Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim diendapkan menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda yaitu 0-20%; 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%.

Ekstrak enzim kasar diukur volumenya dan ditambahkan ammonium sulfat sampai konsentrasi akhir 20%, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dipisahkan dari supernatannya. Endapan dilarutkan dengan larutan *buffer* fosfat 0,1 M pH 7 dan disimpan sebagai endapan 20% (fraksi 20%). Supernatan digunakan untuk pengendapan berikutnya dengan menambahkan lagi ammonium sulfat sampai konsentrasi akhir 40% dan disentrifugasi lagi selama 20 menit. Endapan yang diperoleh dipisahkan dari supernatannya. Endapan dilarutkan dengan larutan *buffer* fosfat 0,1 M pH 6 dan disimpan sebagai endapan 40% (fraksi 40%). Hal yang sama dilakukan dengan konsentrasi akhir ammonium sulfat 100%, sehingga diperoleh fraksi endapan (FE-20%, FE-40%, FE-60%, FE-80% dan FE-100%). Masing-masing fraksi enzim yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya dengan metode *Kunitz* dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.



Gambar 7. Skema proses fraksinasi enzim dengan amonium sulfat

b. Dialisis

Endapan enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui kantong selofan. Endapan tersebut dimasukkan kedalam kantong selofan dan didialisis menggunakan *buffer* fosfat 0,005 M pH 7 selama 24 jam pada suhu dingin.

Selama dialisis, dilakukan pergantian *buffer* selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Hal ini juga digunakan untuk mencegah kantong selofan tersebut pecah. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong. Fraksi hasil dialisis yang diperoleh diuji aktivitasnya dengan metode *Kunitz* dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry. Fraksi hasil dialisis selanjutnya dilanjutkan pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel.

c. Kromatografi Filtrasi Gel

1. Pengembangan Gel

Persiapan kolom dilakukan dengan mengkalibrasi menggunakan 0,05 M *buffer* fosfat pH 7. Matriks *sephadex* G-75 ditimbang sebanyak 10 gram kemudian dilarutkan dengan aquades kemudian didiamkan selama beberapa menit sampai terbentuk dua fase yaitu aquades dan gel. Aquades kemudian dikeluarkan hingga tersisa gel dan diganti dengan *buffer* fosfat pH 7 sebanyak dua kali volume dari gel. Selanjutnya disimpan dalam kulkas selama 24 jam.

Saat ingin digunakan matriks *sephadex* G-75 dicuci menggunakan NaOH, kemudian dicuci lagi menggunakan 0,05 M *buffer* fosfat pH 7 (Seftiono, 2008).

2. Pembuatan Kolom Gel

Kolom dibubuhi dengan kapas pada ujung bawah. Kolom yang telah dipasang tegak lurus selanjutnya dimasukkan perlahan gel yang telah mengembang.

Kemudian dimasukkan elusi dengan 0,05 M *buffer* fosfat pH 7 untuk mencegah adanya gelembung udara yang terperangkap dalam gel.

3. Penempatan Enzim dalam Kolom

Enzim dialisi yang selanjutnya dimasukkan secara perlahan ke dalam kolom yang telah berisi gel *sephadex* G-75. Enzim dialisi dielusi dengan 0,05 M *buffer* fosfat pH 7 dengan kecepatan laju alir 1 mL per menit. Setiap volume fraksi yang diperoleh dari hasil pemurnian ditampung dalam botol vial. Lalu diuji aktivitasnya dengan metode *Kunitz* dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry

3.3.10. Karakterisasi Enzim Protease

a. Penentuan pH Optimum

Penentuan pH terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dan substrat kasein dalam *buffer* fosfat 0,05 M kemudian diinkubasi pada suhu 35°C dalam satu seri *buffer* fosfat 0,05 M dengan variasi pH 6, 7 dan 8. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim.

b. Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dan substrat kasein dengan pH optimum. Dengan variasi suhu uji 35, 40, 45, 50, 55 dan 60°C. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim.

c. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi dilakukan dengan mereaksikan enzim dan substrat kasein dengan pH optimum. Kemudian diinkubasi pada suhu optimum dengan variasi waktu inkubasi 20, 30, 40, 50 dan 60 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim.

3.3.11. Penentuan Kinetika Enzim (Nilai K_M dan V_{maks})

Nilai Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat yang digunakan, yaitu 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25% dan 1,5%. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode *Kunitz*. Nilai aktivitas protease yang diperoleh kemudian digunakan untuk membuat kurva hubungan antara konsentrasi substrat dan aktivitas spesifik enzim. Kemudian hasilnya dimasukkan dalam persamaan linear Lineweaver-Burk. Nilai K_m dan V_{maks} diperoleh dengan rumus berikut (Wahyuntari dan Hendrawati, 2012) :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan : V_o = Kecepatan awal pada konsentrasi substrat [S]
 V_{maks} = Kecepatan maksimum
 K_m = Tetapan Michaelis-Menten enzim bagi substrat tertentu

3.3.12. Penentuan Termodinamika Enzim

a. Uji Stabilitas Termal Enzim

Uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian dapat dilakukan dengan memvariasikan waktu inkubasi. Waktu inkubasi dibutuhkan oleh enzim untuk bereaksi dengan substrat secara optimum. Selanjutnya, aktivitas enzim ditentukan dengan metode *Kunitz*. Dalam penelitian ini, dilakukan pengukuran aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 0; 10; 20; 30; 40; 50 dan 60 menit.

Aktivitas awal enzim (tanpa pemanasan) diberi nilai 100%. Sehingga, aktivitas sisa dapat ditentukan dengan Persamaan 3:

$$\text{Aktivitas sisa (\%)} = \frac{E_i}{E_o} \times 100\%$$

Keterangan:

E_o = Aktivitas sisa enzim pada t_0 atau tanpa inaktivasi

E_i = Aktivitas sisa enzim setelah diinaktivasi selama t_i

b. Penentuan Waktu Paruh ($t_{1/2}$), Konstanta Laju Inaktivasi (k_i), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Waktu paruh dapat dihitung dari persamaan laju reaksi inaktivasi enzim orde satu (Kazan *et al.*, 1997), seperti pada Persamaan 1:

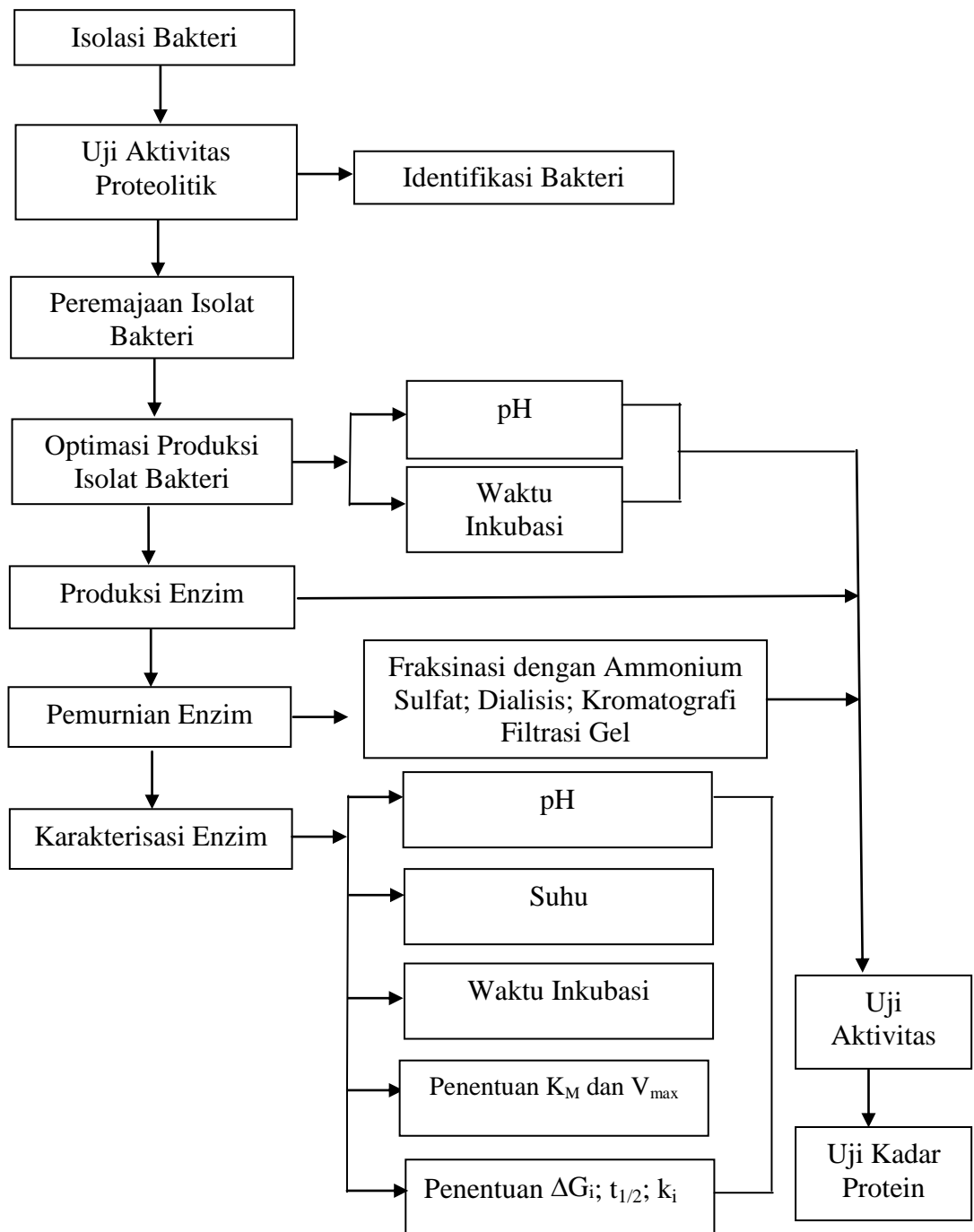
$$t^{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} = \frac{0,693}{k_i}$$

Penentuan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi) enzim protease hasil pemurnian dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) dengan Persamaan 2:

$$\ln \left(\frac{E_i}{E_o} \right) = -k_i t$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i) enzim protease hasil pemurnian dan setelah amobilisasi dilakukan dengan menggunakan Persamaan 4 (Kazan *et al.*, 1997)

$$\Delta G_i = -R T \ln \left(\frac{k_i h}{k_b T} \right)$$



Gambar 8. Skema Penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Didapatkan isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari tanah yaitu isolat PK-IA171 dengan indeks proteolitik sebesar 1,46.
2. Isolat bakteri terpilih yang diidentifikasi merupakan bakteri *Klebsiella* sp.
3. Bakteri *Klebsiella* sp. memiliki kondisi optimum pertumbuhan pada jam ke-42 dan pada pH 7.
4. Aktivitas spesifik enzim protease hasil pemurnian 0,3423 U/mg meningkat 3,15 kali dibandingkan ekstrak kasar yang memiliki aktifitas spesifik 0,1084 U/mg.
5. Enzim hasil pemurnian bekerja optimum pada pH 7, suhu 50 °C dan waktu inkubasi selama 40 menit.
6. Enzim hasil pemurnian diperoleh nilai K_M 6,1 mg ml⁻¹ substrat dan V_{maks} 0,6 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ menit⁻¹.
7. Enzim hasil pemurnian diperoleh nilai k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i berturut-turut adalah 0,0184 menit⁻¹, 37,7 menit dan 101,0565 kJ mol⁻¹.

5.2. Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk penelitian selanjutnya dapat melakukan identifikasi lebih lanjut terhadap bakteri *Klebsiella* sp. dan melakukan penambahan senyawa aditif untuk meningkatkan kestabilan enzim protease yang diisolasi dari *Klebsiella* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, A. G., De Antoni, G. L., and Añon, M. C. 1993. Proteolytic Activity of *Lactobacillus bulgaricus* Grown in Milk. *Journal of Dairy Science*, 76(6):1498–1505.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil Isolasi dan Seleksi Awal Bakteri Penghasil. *Buletin Plasma Nuftah*, 9(2):38–44.
- Akmal, A. H. dan Romita, A. 1996. Isolasi Mikroba Tanah Penghasil Antibiotika dan Sampel Tanah pada Lokasi Penumpukan Sampah (108th ed.). *Cermin Dunia Kedokteran*. 108. 45-46.
- Baehaki, A., Suhartono, M.T., Palupi, N. S., dan Nuhayati, T. 2004. Karakterisasi Proteakunise dari Bakteri Patogen *Staphylococcus Aureus* dan *Klebsiella sp.* *Prosiding Seminar Nasional dan Kongres PATPI*. ISBN: 979- 99965-0-3. 281-287.
- Baysal, Z., Bukut, Y., Yavuz, M., and Aytekin, C. 2014. Immobilization of α - Amylase Via Adsorption Onto Bentonite/Chitosan Composite: Determination of Equilibrium, Kinetics and Thermodynamic Parameters. *Starch*. 66: 484-490.
- Bholay A.D*, More S.Y, Patil V.B. and Niranjana, P. 2016. Bacterial Extracellular Alkaline Proteases and its Industrial Applications. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1:1–5.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga. Jakarta.
- Dwidjoseputro, D. 1985. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.
- Fardiaz, S. 1989. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fox, P. F. 1991. *Food Enzymologi. Elsevier Applied Science, Vol 2*. London.
- Gaman, P. M. 1994. *Ilmu Pangan, Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi* (Edisi 4). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Gupta, R., Beg, Q. K., dan Lorenz, P. 2002. Bacterial Alkaline Proteases; Molecular Approaches and Industrial Application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:15-32.
- Hartley, B. S. 1960. Proteolytic Enzymes. *Annu Rev Biochem*, 29:45–72.
- Hodgson, C. J. 1994. *The Scale Insect Family Coccidae: An Identification Manual to Genera*. CAB International Institute of Entomology. Wallingford.
- Illanes, A. 1999. Stability of Biocatalysts. *Elect. J. Biotechnol.* 2 (1):1-9
- Indra, B. K., dan Retno, D. 2010. Kinetika Reaksi Hidrolisa Pati dari Kulit Nangka dengan Katalisator Asam Chlorida Menggunakan Tangki Berpenaduk. *Makalah Seminar Nasional Teknik Kimia Soeardjo Brotohardjono*. 1-9.
- Jang, Hyeung Jin. Lee, Chang-Hun. Lee, Weontae, and Kim, Yu San. 2007. Two Flexible Loops in Subtilisin-like Thermophilic Protease, Thermicin, From *Thermoanaerobacter yonseiensis*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 35 (5) : 498-507.
- Jawetz, Melnick and Adelberg. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran* (Edisi 23). Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Jayashree, S., Balumuri, A., Renganathan, J., Tongmin, S., and Sundaram S. 2014. Screening and Characterization of Alkaline Protease Produced by a Pink Pigmented Facultive Methylophilic (PPFM) Strain, MSF 46. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 12: 111-120.
- Kamelia, R., Muliawati, S. and Dessy, N. 2005. Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraseluler Termotabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP 1. *Seminar Nasional MIPA UI*. Jakarta.
- Kazan, D., Ertan, H. and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia Coli Penicillin G Acylase* Against Thermal Inactivation By Cross-Linking with Dextran Dialdehyde Polymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2):191–197.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: ii. general properties. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Kusnadi. 2003. *Mikrobiologi (Common Teksbook)*. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung
- Lay, B. W. dan Sugyo, H. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta.
- Leba, M. A. 2017. *Buku Ajar Ekstraksi dan Real Kromatografi*. CV. Budi Utama. Yogyakarta

- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1995. *Dasar-dasar biokimia, Jilid 1. Principles of Biochemistry 1982* (: (Penterjemah & Maggy Thenawijaya). (eds.)). Erlangga. Jakarta.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Far, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265-275.
- Matthews, Harry R., Freedland, Richard A., Miesfeld and Roger L. 1997. *Biochemistry A Short Course*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Mufarrikha, L., Roosdiana, A., dan Prasetyawan, S. 2014. Optimasi Kondisi Produksi Pektinase dari *Aspergillus niger*. *Kimia Student Journal*. 2 (1): 393-399.
- Nagodawithana & Reed. 1993. *Enzymes in Food Processing (Food Science and Technology)*. San Diego Manning, F.C. and R.E. Thompson 1995. Oilfield Processing, Crude Oil. Tulsa, PennWell Books, p.5.
- Naiola, E. dan Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi*, 8:467-473.
- Nanik, S., A.S. Yandri, dan Hadi, S. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia. *Jurnal Analis Kesehatan*. **5** (1): 475-482.
- Novitasari, Y., Pangastuti, A., dan Rakhmawati, R. 2014. Penghambatan produksi enzim eksoprotease pada sistem quorum sensing *Aeromonas hydrophila* dengan pemberian ekstrak metanol rimpang segar dan rimpang kering lengkuas (*Alpinia galanga*). *Biofarmasi*. **12** (2): 51-61.
- Page, D. S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Palmer, T. 1995. *Understanding Enzyme* (Fourth Edi). Ellis Haward. New York.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi, diterjemahkan oleh Hadioetomo*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pamaya, D., Muchlissin, S. I., Maharani, E. T. W., Darmawati, S., dan Ethica, S. N., 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus amyloliquefacines* Irod 2 Pada Ocom Merah Pasca Fermentasi 48 Jam. *Seminar Nasional Edusaintek* (pp 40-46).
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, F. M. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.

- Poernomo, A. T., dan Purwanto, D. A. 2003. Uji Aktivitas “Crude” Enzim Proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah. *Airlangga Journal of Pharmacy*, 103–107.
- Poliana J, M. A. 2007. *Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications*. Springer. Dordrecht.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M. Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. (Microbiology). *Microbiology and Molecular Biology Rev. Sci Am*, **62**: 597-635.
- Ratnayani Ketut, A. A. I. A., Mayun, L., dan Maman, S. 2015. Penentuan Laju Reaksi Maksimal (Vmaks) dan Konstanta Michaelis-Menten (Km) Enzim Lipase Pankreas Pada Substrat Minyak Kelapa, Minyak Sawit, dan Minyak Zaitun. *Jurnal Kimia*. **9** (1): 93-97.
- Scopes, R. K. 1993. *Enzym Activity and Assays*. Encyclopedia of Life Sciences. Australia.
- Selvarajan, E., Mohanasrinivasan, V., Subathra, D. C., and George, P. D. C. 2015. Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* **38** (9): 1655-1669.
- Shahib, N. 2005. *Biologi Molekular Medik I*. Universitas Padjajaran Bandung Press. Bandung.
- Soeka, Y. S., dan Sulistiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis* A₁ InaCC B398 Yang Diisolasi Dari Terasi Samarinda. *Berit Biologi*. **13** (2): 206-207.
- Sorensen, H., Sorensen, S., Bjerregaard, C., Michelson, S. 1999. *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Stryer, L., Berg, J. M., and Tymoczko, J. L. 2002. *Chapter 8 Biochemistry 5th Ed.* WH Freeman. New York.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suhartono, M. T. 2000. Eksplorasi Protease Bakteri Asal Indonesia untuk Aplikasi Industri dan Riset Bioteknologi. *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*. 125-133.
- Sumardi, Farisi, S., Ekowati, C. N., dan Diana, S. M. Aktivitas dan Karakterisasi Protease Isolat *Bacillus* sp. (UJ132) Secara Kualitatif dan Kuantitatif. *Jurnal Riset Akuakultur*, **14** (3): 193-199.

- Vishwanatha T., Spoorthi-Jain N., Reena V., Divyashree BC., Siddalingeshwara K. G., Karthic J. dan Sudipta K. M. 2010. Screening of Substrates for Protease Production from *Bacillus licheniformis*. *International Journal Eng Sci Technol.* **2** (11): 6550-6554.
- Wahyuntari, B. dan Hendrawati, H. 2012. Properties of an Extracellular Protease of *Bacillus megaterium* DSM 319 as Depilating Aid of Hides. *Microbiology Indonesia*, **6** (2):4.
- Walker and M. John. 2002. *Protein Protocols Handbook*. Humana Press Inc. Totowa.
- Wardani, A. K., dan Nindita, L. O. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease Dari Bakteri Hasil Isolasi Dari Whey Tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian* **13** (3): 149-156.
- Ward, O. 1993. *Protease*. In Forgati WM. *Microbial and enzyme biotechnology* (9th ed.). Applied Science Publish. New York.
- Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X. Y., and Alan, J. R. 1996. Polyethylene glycol-induced stabilization fo subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 82-89.
- Yati, S. S., Rahayu, S. H., Setiamimgrum, N., dan Naiola, E. 2011. Kemampuan *Bacillus licheniformis* Dalam Memproduksi Enzim Protease Yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Media Litbang Kesehatan* **21** (2): 92-93.
- Zaidatul, A. 2009. Produksi dan Karakterisasi Protease Isolat Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Plantungan-Kendal. *Skripsi Jurusan Kimia Universitas Negeri Semarang*. Semarang.