

**PENGARUH PENAMBAHAN GLISEROL TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI *Klebsiella sp.* LPG172**

(Skripsi)

Oleh

**PUTRI AYU SAFITRI
1917011092**



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

2024

**PENGARUH PENAMBAHAN GLISEROL TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI *Klebsiella sp.* LPG172**

Oleh

PUTRI AYU SAFITRI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
Sarjana Sains**

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK**PENGARUH PENAMBAHAN GLISEROL TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI *Klebsiella sp.* LPG172****Oleh****PUTRI AYU SAFITRI**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh gliserol terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172. Produksi enzim protease dilakukan dengan menumbuhkan *Klebsiella sp.* LPG172 pada media dengan 1% susu skim yang dilarutkan dalam larutan buffer fosfat 0,05 M pada pH 7. Enzim dipanen setelah fermentasi selama 42 jam dan dimurnikan melalui fraksinasi ammonium sulfat serta dialisis. Aktivitas enzim dihitung dengan metode Kunitz dan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Karakterisasi enzim mencakup pengujian pH, suhu, dan waktu inkubasi optimum. Aktivitas optimum protease tercapai pada pH 7, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 40 menit. Enzim hasil dialisis diuji tanpa dan dengan penambahan gliserol pada konsentrasi 0,5 M, 1,0 M, dan 1,5 M. Pada pH 7, penambahan gliserol 0,5 M, 1,0 M, dan 1,5 M meningkatkan aktivitas enzim masing-masing sebesar 5,00%, 18,18%, dan 8,36%. Pada suhu 50°C, penambahan gliserol 0,5 M, 1,0 M, dan 1,5 M meningkatkan aktivitas enzim sebesar 2,46%, 14,26%, dan 8,11%. Pada waktu inkubasi 40 menit, peningkatan aktivitas enzim dengan penambahan gliserol 0,5 M, 1,0 M, dan 1,5 M adalah 5,40%, 8,88%, dan 18,79%. Hasil menunjukkan bahwa penambahan gliserol mampu meningkatkan aktivitas enzim protease dari *Klebsiella sp.* LPG172 tanpa mengubah kondisi kerja optimum enzim, yaitu pada pH 7, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 40 menit. Konsentrasi gliserol 1,0 M memberikan peningkatan aktivitas yang konsisten dan signifikan.

Kata kunci: protease, *Klebsiella sp.*, gliserol.

ABSTRACT

THE EFFECT OF GLYCEROL ON THE PROTEASE ENZYME ACTIVITY OF *Klebsiella* sp. LPG172 BACTERIA

BY

PUTRI AYU SAFITRI

This study aims to investigate the effect of glycerol on the activity of the protease enzyme from *Klebsiella* sp. LPG172. Protease enzyme production was conducted by cultivating *Klebsiella* sp. LPG172 in a medium containing 1% skim milk dissolved in 0.05 M phosphate buffer solution at pH 7. The enzyme was harvested after 42 hours of fermentation and purified through ammonium sulfate fractionation and dialysis. Enzyme activity was measured using the Kunitz method, and protein content was determined using the Lowry method. Enzyme characterization included determining the optimal conditions for enzyme activity, including pH, temperature, and incubation time. The optimal activity of the protease was achieved at pH 7, 50°C, and 40 minutes of incubation time. The dialyzed enzyme was tested without and with the addition of glycerol at concentrations of 0.5 M, 1.0 M, and 1.5 M. At pH 7, the addition of 0.5 M, 1.0 M, and 1.5 M glycerol increased enzyme activity by 5.00%, 18.18%, and 8.36%, respectively. At 50°C, the addition of 0.5 M, 1.0 M, and 1.5 M glycerol increased enzyme activity by 2.46%, 14.26%, and 8.11%, respectively. At 40 minutes of incubation, the addition of 0.5 M, 1.0 M, and 1.5 M glycerol increased enzyme activity by 5.40%, 8.88%, and 18.79%, respectively. The results show that the addition of glycerol can enhance the activity of the protease enzyme from *Klebsiella* sp. LPG172 without altering the enzyme's optimal working conditions, which are pH 7, 50°C, and 40 minutes of incubation time. The 1.0 M glycerol concentration consistently and significantly increased enzyme activity.

Keyword: protease, *Klebsiella* sp, glycerol.

Judul Skripsi : **PENGARUH PENAMBAHAN GLISEROL
TERHADAP AKTIVITAS ENZIM
PROTEASE DARI BAKTERI *Klebsiella sp.*
LPG172**

Nama Mahasiswa : **Putri Ayu Safitri**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011092

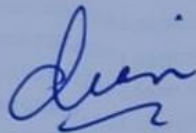
Program Studi : Kimia

Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

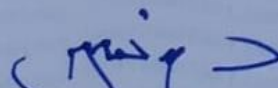
1. Komisi Pembimbing

Pembimbing 1



Dr. Dian Herasari, M.Si.
NIP. 1971080662000032001

Pembimbing 2



Mulyono, Rh.D.
NIP. 197406112000031002

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung

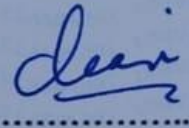


Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

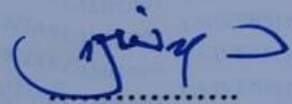
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

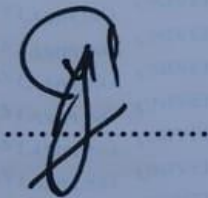
Ketua : Dr. Dian Herasari, M.Si.



Sekretaris : Mulyono, Ph.D.



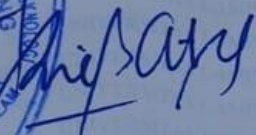
Anggota : Prof. Dr. John Hendri, M.S.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 24 Juli 2024

LEMBAR PENGESAHAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Putri Ayu Safitri
NPM : 1917011092
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul "**Pengaruh Penambahan Gliserol Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri *Klebsiella sp. LPG172***" adalah benar karya saya sendiri dan saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 24 Juli 2024
Yang menyatakan,



Putri Ayu Safitri
NPM. 1917011092

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Putri Ayu Safitri lahir di Jakarta pada tanggal 5 Desember 2000. Penulis merupakan anak kedua dari tiga bersaudara, putri dari Bapak Supriyatno dan Ibu Aminah. Penulis pertama kali menempuh pendidikan di Taman Kanak-kanak Rosita yang diselesaikan pada tahun 2005. Kemudian dilanjutkan ke Sekolah Dasar di SD Negeri Cibodas 5 yang ditamatkan pada tahun 2012. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 20 Tangerang lalu pada tahun 2013 pindah ke SMP Negeri 1 Mauk dan lulus pada tahun 2015. Lalu penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 2 Kabupaten Tangerang hingga tahun 2018.

Pada tahun 2019, penulis diterima di Jurusan S1 Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif berpartisipasi dalam organisasi kemahasiswaan di tingkat Fakultas yang mana tergabung dalam anggota Biro Kesekretariatan Himpunan Mahasiswa Jurusan Kimia (HIMAKI) FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2020. Penulis juga pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah ke 30 yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Universitas Lampung tahun 2019.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Cilangkap, Kecamatan Kalanganyar, selama 40 hari. Setelah melaksanakan kewajiban KKN, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia FMIPA

Universitas Lampung dari bulan Juli tahun 2022 hingga bulan September tahun 2022 dengan judul “Uji Efektivitas Penurunan Kadar MLSS Pada Limbah Cair Tahu Menggunakan Biodekomposer Biotama”. Selama menjalani perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Biokimia untuk mahasiswa jurusan Biologi dan Biologi Terapan pada tahun 2024.

MOTTO

Maka sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya
bersama kesulitan ada kemudahan
(QS. Al-Insyirah : 5-6)

Diwajibkan atas kamu berperang, padahal itu tidak menyenangkan bagimu. Tetapi
boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh
jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui,
sedang kamu tidak mengetahui
(QS. Al-Baqarah : 216)

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya
(QS. Al-Baqarah : 286)

Every test has an end; just keep going with patience and faith
(Anonim)

Jangan pernah bergantung terlalu banyak kepada siapapun di dunia ini. Karena
bahkan bayangan milikmu sendiri akan meninggalkanmu saat kamu berada di
dalam kegelapan
(Imam Ibnu Taimiyyah Rahimahullah)

PERSEMBAHAN

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas Rahmat-Nya serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW.



Karya sederhana ini ku persembahkan sebagai wujud cinta, bakti, dan sayangku kepada:

**Kedua orang tua tercinta
Bapak Supriyatno dan Ibu Aminah**

Yang senantiasa memberikan motivasi, nasihat, cinta dan kasih, doa, serta dukungan secara moril dan finansial kepada penulis selama ini.

**Kakak Serta Adikku Tersayang
Jumanto Aji Pratama dan Kholil Ibrahim**

Terima kasih telah senantiasa memberikan doa dan dukungan kepada penulis

Rasa hormat saya kepada:

**Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si. | Bapak Mulyono, Ph.D. | Bapak Prof. Dr. John
Hendri M.S.**

Serta seluruh dosen Jurusan Kimia

Terima kasih telah mendidik, membimbing, dan memberikan wawasan selama penulis menempuh pendidikan di kampus hingga mendapat gelar sarjana. Semoga Allah SWT membalas kebaikan bapak dan ibu kelak, Aamiin.

Keluarga besar dan sahabat-sahabat seperjuangan

dan

Almamater tercinta, Universitas Lampung

SAN WACANA

Assalammu 'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuuh.

Alhamdulillahirabbil'alaamiin. Segala puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahuwata'aalaa, serta tak lupa pula salam cinta kepada Baginda Nabi Muhammad SAW, karena berkat Rahmat dan Hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul "Pengaruh Penambahan Gliserol Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri *Klebsiella sp.* LPG172" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Selain bersyukur kepada dzat pencipta bumi dan kekasihNya, penulis juga ingin berterima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini. Adapun pihak-pihak tersebut, antara lain:

1. Kedua orang tuaku, terutama Ibu Aminah yang telah memberikan dukungan penuh dalam segala hal—doa, nasihat, pengorbanan, serta kasih sayang yang tiada henti. Terima kasih, Ibu, karena selalu ada di setiap langkah perjalanan ini, memberikan kekuatan dan cinta yang tidak pernah pudar. Doa-doa dan kehadiran Ibu adalah sumber utama keberkahan dan kelancaran penulis dalam menyelesaikan pendidikan ini. Terima kasih juga kepada Bapak Supriyatno, meskipun tidak banyak terlibat, penulis tetap berterima kasih atas doa dan peran yang pernah diberikan dalam hidup penulis.
2. Kakak serta adikku; Jumanto Aji Pratama dan Kholil Ibrahim atas dukungan dan kehadirannya selalu menjadi motivasi tambahan bagi penulis.

3. Kakek, bibi-bibi, serta om-omku atas segala doa, dukungan moral dan bantuan yang telah diberikan selama penulis menyelesaikan pendidikan.
4. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., sebagai pembimbing I penulis. Terima kasih atas bimbingan, arahan, dukungan, dan ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis mulai dari saat penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan hingga melaksanakan penelitian untuk menuntaskan skripsi ini.
5. Bapak Mulyono, Ph.D, selaku Dosen Pembimbing II. Terima kasih atas segala saran, bimbingan, ilmu, semangat, kesabaran, dan waktunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Bapak Prof. Dr. John Hendri M.S., selaku dosen pembahas. Terima kasih karena telah memberikan masukan-masukan yang membangun untuk kemudian dijadikan sebuah pembelajaran oleh penulis.
7. Bapak Prof. Dr. Rudy TM Situmeang, M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik, penulis mengucapkan terima kasih banyak atas bimbingan, nasihat, motivasi, dan kesabaran dalam membimbing penulis selama masa perkuliahan.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si.,M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
9. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
10. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu baik dalam bidang akademik maupun non akademik.
11. Laboran laboratorium Biokimia, staff administrasi, satuan pengaman, dan seluruh pegawai di lingkungan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
12. Teman-teman serta adik-adik Lab Biokimia terima kasih telah memberikan semangat, dan dukungannya sehingga penulis mampu

menyelesaikan penelitian dengan baik.

13. Teman-teman Kimia 2019 atas segala kenangan selama kuliah.
14. Farhan Ardiansyah Pratama seorang lelaki yang selama ini menjadi penyemangat dan motivasi penulis selama berjalannya proses skripsi ini. Terima kasih telah membantu, menemani, serta sabar, semoga Allah membalas kebaikanmu.
15. Kepada diri saya sendiri Putri Ayu Safitri, terima kasih telah kuat berjuang dan bertahan sampai akhir.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat beberapa ketidaksempurnaan, tetapi penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan di masa depan.

Bandar Lampung, 24 Juli 2024
Penulis

Putri Ayu Safitri

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Bakteri	5
2.2. <i>Klebsiella sp.</i>	8
2.3. Enzim	9
2.4. Enzim Protease	9
2.5. Pemurnian Enzim.....	12
2.6. Uji Aktivitas Protease Metode Kunitz	14
2.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	15
2.8. Senyawa Aditif	15
2.9. Poliol (Alkohol Polihidrat)	16
III. METODE PENELITIAN	18
3.1. Waktu dan Tempat.....	18
3.2. Alat dan Bahan.....	19
3.3. Prosedur Penelitian	19
3.3.1. Tahap Persiapan	18
3.3.2. Peremajaan Isolat Bakteri	20
3.3.3. Pengukuran Aktivitas Protease	20
3.3.4. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	21
3.3.5. Produksi Enzim Protease	21
3.3.6. Pemurnian Enzim Protease	22
3.3.9. Penambahan Gliserol	23

3.3.10. Karakterisasi Enzim Protease	23
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1. Produksi Enzim Protease	26
4.2. Pemurnian Enzim Protease	Error! Bookmark not defined.
4.3. Karakterisasi Enzim Protease Hasil Dialisis dan Setelah Penambahan Gliserol.....	30
4.3.1. Penentuan pH Optimum Aktivitas Enzim Protease	30
4.3.2. Penentuan Suhu Optimum Aktivitas Enzim Protease.....	31
4.3.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Aktivitas Enzim Protease.	33
V. KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1. Kesimpulan	36
5.2. Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN.....	40

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pemurnian Enzim Protease dari <i>Klebsiella sp.</i>	28
2. Absorbansi Tirosin pada Berbagai Konsentrasi	40
3. Absorbansi BSA pada Berbagai Konsentrasi	42
4. Hubungan Antara Kejenuhan Ammonium Sulfat pada Berbagai Fraksi dengan Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri <i>Klebsiella sp.</i> LPG172.....	45
5. Hubungan Antara Kejenuhan Ammonium Sulfat 0-20% dan 20-90% dengan Aktivitas Enzim Protease dari Bakteri <i>Klebsiella sp.</i> LPG172.....	45
6. Hubungan Antara pH dengan Aktivitas Unit Enzim Protease Hasil Dialisis dan Hasil Penambahan	47
7. Hubungan Antara Suhu dengan Aktivitas Unit Enzim Protease Hasil Dialisis dan Hasil Penambahan	48
8. Hubungan Antara Waktu Inkubasi dengan Aktivitas Unit Enzim Protease Hasil Dialisis dan Hasil Penambahan	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil Uji Kualitatif Zona Bening	11
2. Struktur Gliserol.....	16
3. Skema Proses Fraksinasi Enzim dengan Amonium Sulfat	22
4. Diagram Alir Penelitian	24
5. Fraksinasi Ammonium Sulfat dengan Tingkat Kejenuhan : (0-20)%, (20-40)%, (40-60)% dan (60- 80)%	26
6. Fraksinasi Ammonium Sulfat dengan Tingkat Kejenuhan : (0-20)% dan (20-90)%	27
7. Penentuan pH Optimum Enzim Protease Hasil Dialisis dan Enzim Setelah Penambahan Gliserol	29
8. Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease Hasil Dialisis dan Enzim Setelah Penambahan Gliserol	31
9. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Enzim Protease Hasil Dialisis dan Enzim Setelah Penambahan Gliserol.....	33
10. Kurva Standar Tirosin	40
11. Kurva Standar BSA	42

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim adalah golongan protein yang disintesis oleh sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai biokatalisator dalam setiap reaksi metabolisme yang terjadi pada organisme hidup. Enzim dapat diaplikasikan pada berbagai bidang antara lain pada proses industri. Hal ini disebabkan karena enzim mempunyai efisiensi dan efektivitas yang tinggi, serta reaksinya yang tidak menimbulkan produk samping (Nugraha dan Maulina, 2013). Salah satu jenis enzim yang mempunyai peran penting dalam pertumbuhan industri adalah enzim protease. Enzim protease berperan besar dalam perombakan komponen protein melalui reaksi hidrolisis yang dapat memutus ikatan peptida antara asam amino pada protein tersebut. Protease dapat dihasilkan secara ekstrasel dan intrasel, mempunyai peranan penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel. Protease merupakan kelompok enzim-enzim yang sangat kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersil (Poliana dan MacCabe, 2007).

Secara komersial protease menguasai 60% total penjualan enzim yang pemanfaatannya sebagai biokatalisator yang efisien, selektif, ekonomis, tidak beracun, dapat mengkatalisis tanpa produk samping serta memiliki keuntungan dapat ditinjau dari beberapa aspek, seperti konversi bahan baku menjadi produk lebih baik, dan ramah terhadap lingkungan. Menurut Hodgson (1994) Industri menggunakan enzim protease sekitar 30-35%, enzim amilase sekitar 10-12%, dan enzim lipase sekitar 2-3%. Enzim protease banyak digunakan dalam berbagai industri, seperti industri makanan, detergen dan farmasi. Enzim protease dapat ditemukan di berbagai organisme baik prokariot maupun eukariot (Motyan *et al*,

2013). Mikroorganisme, terutama bakteri merupakan sumber protease yang paling banyak dimanfaatkan karena penanganannya yang mudah dan biaya produksi yang relatif lebih ekonomis (Razzaq *et al*, 2019). Salah satu bakteri yang menghasilkan enzim protease adalah bakteri *Klebsiella sp.*

Bakteri *Klebsiella sp.* merupakan bakteri gram negatif dari famili Enterobacteriaceae yang tidak dapat bergerak karena tidak memiliki flagela namun mampu memfermentasikan asam dan gas. Pada Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung terdapat bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 yang diisolasi dari tanah tercemar minyak nabati di Bandar Lampung mempunyai aktivitas proteolitik dengan indeks proteolitik sebesar 1,46 dapat memproduksi enzim protease dengan menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA) pada waktu optimum 42 jam. Enzim protease dari bakteri tersebut memiliki kondisi optimum dalam bereaksi hidrolisis pada substrat protein pada pH 7 dengan suhu 50°C dan waktu inkubasi selama 40 menit (Herasari dkk., 2022).

Pada umumnya, enzim tidak stabil pada kondisi suhu yang tinggi dan pH yang ekstrem (Goddette *et al.*, 1993), kondisi yang umumnya diperlukan dalam proses-proses industri (Vielle dan Zeikus, 1996). Untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas dan aktivitas yang tinggi pada kondisi ekstrem, dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu aplikasi teknik amobilisasi, modifikasi kimia, rekayasa molekuler dan penambahan zat aditif. Penggunaan zat aditif lebih sering dipilih karena relatif lebih mudah dan biayanya murah (Mosan dan Combes, 1984). Salah satu zat aditif penstabil yang mudah digunakan adalah poliol (polihidroksi alkohol). Penggunaan poliol sebagai zat aditif penstabil memiliki beberapa kelebihan diantaranya yaitu meningkatkan stabilitas dan lama waktu penyimpanan enzim, sifat hidrofilik dari gugus hidroksilnya dapat menurunkan aktivitas air, serta dapat meningkatkan interaksi hidrofobik di antara molekul protein enzim serta dapat bekerja sebagai penangkap atau pengikat senyawa radikal bebas sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya oksidasi enzim (Suhartono, 1989). Adapun senyawa aditif yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah gliserol, dimana gliserol merupakan suatu polihidroksi yang memiliki jumlah atom karbon tiga atau

lebih yang diketahui sangat reaktif untuk menarik molekul air dan meningkatkan interaksi hidrofobisitas diantara molekul enzim.

Dalam literatur, telah dilaporkan bahwa penambahan gliserol dapat mempengaruhi aktivitas enzim protease. Penelitian oleh Fauziah dkk. (2012) mengenai pengaruh penambahan gliserol dengan variasi konsentrasi 0,5; 1; 1,5 M terhadap aktivitas enzim protease dari *Actinomyces* ANL4 2b-3 menunjukkan bahwa meskipun tidak terjadi perubahan pada pH, suhu, dan waktu inkubasi optimum enzim setelah penambahan gliserol, namun aktivitas enzim berhasil ditingkatkan, dengan peningkatan tertinggi terjadi pada konsentrasi gliserol 1 M. Sementara itu, penelitian oleh Yestikasari (2022) tentang pengaruh penambahan gliserol terhadap stabilitas enzim protease dari jamur *Aspergillus niger* menunjukkan adanya perubahan pada pH dan suhu optimum enzim protease setelah penambahan gliserol. Meskipun demikian, penambahan gliserol berhasil meningkatkan aktivitas enzim pada rentang pH dan suhu tertentu. Berdasarkan penelitian tersebut, didapati bahwa gliserol dengan variasi 0,5; 1; 1,5 M mampu meningkatkan aktivitas enzim protease. Dengan demikian, pada penelitian ini dilakukan kajian berupa pengaruh gliserol terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh gliserol pada berbagai variasi konsentrasi terhadap aktivitas enzim dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172.
2. Untuk mengetahui kondisi optimum enzim protease dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 setelah ditambahkan gliserol.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan gliserol pada aktivitas enzim protease *Klebsiella sp.* LPG172 yang berguna, sehingga dapat meningkatkan pemanfaatannya dalam bidang industri, penelitian, ilmu pengetahuan dan sebagainya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri adalah mikroba prokariotik yang uniseluler, ukuran sel-sel hanya beberapa mikron. Bakteri sangat bervariasi tergantung masing-masing spesiesnya sehingga tidak dapat dilihat dengan mata telanjang dan berkembang biak dengan cara aseksual dengan pembelahan sel. Bakteri hidup secara bebas, parasit, saprofit, sebagai patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Walaupun bentuknya bermacam-macam, tetapi pada dasarnya strukturnya terdiri atas dinding sel, membran sitoplasma, sitoplasma, serta inti sel (Riskawati, 2016).

Berdasarkan perbedaannya di dalam menyerap zat warna Gram, bakteri dibagi atas dua golongan yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu karena kompleks kristal violet-iodin tetap dipertahankan. Sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena kompleks warna kristal violet-iodin larut oleh alkohol, lalu menyerap zat warna kedua yaitu safranin. Perbedaan hasil dalam pewarnaan tersebut disebabkan perbedaan struktur, terutama dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut (Sari, 2014).

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri yaitu:

1) Nutrisi

Sumber zat makanan (nutrisi) bagi bakteri diperoleh dari senyawa karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, unsur logam, vitamin dan air untuk fungsi-fungsi metabolik dan pertumbuhannya. Karbon merupakan nutrisi paling penting yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri dan sebagai atom pusat untuk semua struktur dan fungsi seluler (Cappuccino dan Sherman, 2014). Nitrogen diperlukan untuk menyintesis asam amino yang selanjutnya akan digunakan

untuk menyintesis protein, DNA dan RNA. Bakteri memperoleh nitrogen dari proses dekomposisi bahan organik atau berasal dari ion ammonium serta dari senyawa nitrat dan nitrogen yang berada di udara melalui proses fiksasi. Sulfur diperlukan bakteri untuk sintesis protein bersama dengan nitrogen. Sumber sulfur dapat diperoleh dalam bentuk ion sulfat atau berasal dari H₂S yang terdapat di alam. Fosfor juga dibutuhkan bakteri untuk sintesis ATP. Ion logam dibutuhkan bakteri agar proses aktivitas seluler dapat berjalan secara efisien. Aktivitas seluler yang dimaksud adalah osmoregulasi, pengaturan aktivitas enzim dan transportasi elektron selama oksidasi hayat.

2) pH

Bakteri membutuhkan pH optimal untuk pertumbuhannya. Umumnya, pH optimal bakteri antara 6,5-7,5 atau pada pH netral. Namun, beberapa spesies dapat tumbuh dalam keadaan sangat asam atau sangat alkali. Bagi kebanyakan spesies, nilai pH minimum dan maksimum ialah antara 4 dan 9. Untuk mempertahankan pH tetap konstan, maka dapat ditambahkan larutan penyangga (garam dari fosfat atau garam dari asetat) pada media (Hafsan, 2011).

3) Suhu

Suhu merupakan faktor lingkungan yang sangat penting yang dapat memengaruhi aktivitas organisme. Umumnya, bakteri tumbuh pada suhu di atas 35°C. Namun, setiap spesies bakteri memiliki suhu optimum untuk pertumbuhan (Hafsan, 2011).

4) Oksigen

Dengan dasar kebutuhan akan oksigen bebas untuk kegiatan respirasi, bakteri dibagi menjadi dua:

- Bakteri aerob: memerlukan oksigen bebas untuk kegiatan respirasinya.
- Bakteri anaerob: tidak memerlukan oksigen bebas untuk kegiatan respirasinya

5) Kadar air

Bakteri sebenarnya merupakan mikroorganisme yang suka akan keadaan basah, bahkan dapat hidup di dalam air, tetapi tidak dapat hidup subur di dalam air yang tertutup. Hal ini disebabkan karena kurangnya udara. Tanah yang basah

baik untuk kehidupan bakteri. Sebaliknya, banyak bakteri yang mati jika terkena udara kering.

6) Tekanan osmotik

Tekanan osmotik sangat diperlukan untuk mempertahankan bakteri agar tetap hidup. Apabila bakteri dalam larutan yang konsentrasinya lebih tinggi daripada konsentrasi yang ada dalam sel bakteri, maka akan terjadi keluarnya cairan dari sel bakteri melalui membran sitoplasma yang disebut *plasmolysis*. Medium yang paling cocok untuk kehidupan bakteri ialah medium yang isotonik terhadap sel bakteri. Namun, ada beberapa bakteri yang membutuhkan tekanan osmotik yang tinggi disebut osmofilik (Brooks, 2005).

Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan penambahan volume dan ukuran sel serta penambahan jumlah sel. Fase pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi 4 fase, yaitu fase *lag* (fase lamban), fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian.

1) Fase *Lag*

Fase *lag* merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase *lag* pada bakteri sangat bervariasi tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Fase ini ditandai dengan peningkatan komponen makromolekul dan aktivitas metabolik.

2) Fase Eksponensial

Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang sangat cepat. Derajat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh kadar nutrisi dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Komposisi sel bakteri dan bahan metaboliknya relatif konstan untuk jangka waktu tertentu. Hal ini tergantung dari sifat-sifat alamiah bakteri seperti genetik dan lingkungannya.

3) Fase Stasioner

Fase stasioner disebut juga fase statis adalah fase dimana laju pertumbuhan dan perkembangan bakteri mencapai titik terendah atau boleh dikatakan nol sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap.

4) Fase Penurunan

Fase penurunan disebut juga fase kematian ditandai dengan terjadinya peningkatan laju kematian sel bakteri sehingga terjadi penurunan populasi bakteri. Laju pertumbuhan bakteri menjadi negatif (Yulianti, 2019). Pertumbuhan sel bakteri dapat ditunjukkan dalam bentuk kurva.

2.2. *Klebsiella sp.*

Berikut ini merupakan klasifikasi dari bakteri *Klebsiella sp.*:

Kingdom	: Bacteriae
Phylum	: Proteobacteria
Classis	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Species	: <i>Klebsiella sp.</i>

Klebsiella sp. pertama kali diteliti dan diberi nama oleh *bacteriologist* Jerman yang bernama Edwin Klebs (1834-1913). *Klebsiella sp.* merupakan bakteri gram negatif dari famili Enterobacteriaceae. Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen, *Klebsiella sp.* merupakan bakteri anaerob fakultatif. *Klebsiella sp.* berbentuk batang pendek, tidak membentuk spora, tidak bergerak, mempunyai selubung atau kapsul yang tebal, memiliki ukuran 0,5-1,5 μ . *Klebsiella sp.* tidak mampu bergerak karena tidak memiliki flagela, tetapi mampu memfermentasikan karbohidrat membentuk asam dan gas. Spesies *Klebsiella sp.* menunjukkan pertumbuhan mukoid, dan kapsul polisakarida yang besar. *Klebsiella* terdapat di selaput lendir, mulut dan usus orang sehat sebagai flora normal. Beberapa spesies *Klebsiella* antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Infeksi nosokomial oleh karena *Klebsiella sp.* sebagian besar disebabkan oleh spesies *Klebsiella pneumoniae*. Selain itu, terdapat pula *Klebsiella oxytoca* yang telah diisolasi dari spesimen klinis manusia. Namun, persentasenya jauh di bawah *Klebsiella pneumoniae* (Mardiyantoro, 2018).

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram isolat bakteri *Klebsiella sp.* termasuk bakteri gram negatif. Pada pengamatan mikroskop karakteristik bakteri *Klebsiella sp.* berupa batang pendek, berwarna merah, dan berlendir pada koloninya (Salsabilla, 2021). Hal ini sesuai yang dicantumkan dalam buku Mikrobiologi yang menyatakan bahwa *Klebsiella sp.* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek, mempunyai kapsul yang tebal, tergolong bakteri yang tidak dapat bergerak (Kurniawan, 2018). Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen, *Klebsiella sp.* merupakan bakteri anaerob fakultatif. Bakteri ini dinamai *Klebsiella sp.* LPG172 dengan LPG dari keterangan Lampung, serta 17 untuk apresiasi mahasiswa angkatan 2017 yang telah mendapatkan isolat dan nomor 2 untuk penomoran isolat yang telah diperoleh.

2.3. Enzim

Enzim adalah benda tak hidup yang diproduksi oleh sel hidup. Enzim menyusun sebagian besar total protein dalam sel. Suatu sel dapat memuat 2000 jenis molekul enzim. Enzim berfungsi sebagai katalis suatu reaksi yang dapat meningkatkan laju reaksi melalui penurunan energi aktivasi. Penurunan energi aktivasi dilakukan dengan cara membentuk kompleks enzim dengan substrat. Kompleks enzim substrat akan terurai menjadi produk. Enzim dilepaskan untuk membentuk kompleks baru dengan substrat lain setelah produk dihasilkan. Enzim memiliki bagian sisi aktif yang berfungsi sebagai tempat terikatnya substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat, dan selanjutnya membentuk produk akhir (Lehninger, 1997).

Enzim memiliki dua komponen penyusun yang terdiri atas protein dan non protein. Komponen penyusun enzim berupa protein yang sifatnya tidak tahan panas disebut apoenzim. Komponen penyusun enzim non-protein disebut gugus prostetik yang terdiri atas ion-ion anorganik atau ion-ion organik. Ion anorganik disebut kofaktor yang mampu meningkatkan kerja enzim. Ion organik disebut koenzim yang berfungsi untuk memindahkan zat kimia dari satu enzim ke enzim lain (Lehninger,

1997). Enzim akan aktif jika ada kofaktor sedangkan inhibitor akan menghambat enzim dengan cara menempel pada bagian enzim atau dengan cara berikatan langsung pada sisi aktif enzim sehingga menyebabkan sisi aktif enzim berubah (Sajuthi dkk., 2010).

Faktor-faktor yang memengaruhi aktivitas enzim adalah suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, inhibitor, dan aktivator. Enzim adalah suatu protein sehingga kenaikan suhu dapat menyebabkan denaturasi enzim dan bagian aktif enzim akan terganggu sehingga konsentrasi dan kecepatan enzim berkurang. Kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi (Risnawati dan Cahyaningrum, 2013).

Reaksi enzimatik dapat dibagi dalam 3 fase. Selama fase I, kompleks enzim-substrat (ES) terakumulasi tanpa pembentukan produk dan konsumsi substrat (S) yang signifikan. Fase dimulai ketika konsentrasi enzim substrat mencapai nilai tertinggi yang tetap, tidak berubah untuk satu periode. Durasi kondisi stabil konsentrasi enzim-substrat tergantung pada konsentrasi relatif antara enzim (E) dan substrat (S). Selama fase II, substrat digunakan dan produk (P) terakumulasi dalam media reaksi. Selama fase III, ketika konsentrasi enzim-substrat tidak lagi konstan, penggunaan substrat dan pembentukan produk terjadi secara perlahan (Vitolo, 2015).

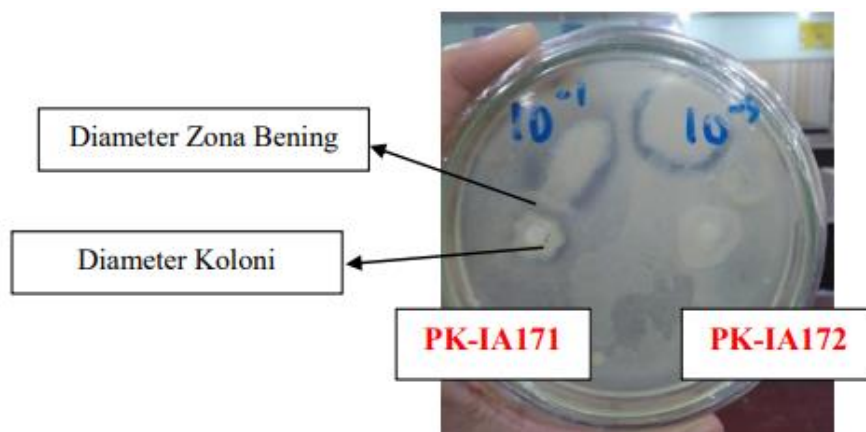
2.4. Enzim Protease

Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada molekul yang menghasilkan peptida atau asam amino. Hidrolisis ikatan peptida adalah reaksi penambahan-penghilangan, dimana protease bertindak sebagai nukleofilik atau bereaksi dengan membentuk satu molekul air. Secara umum nukleofilik membentuk intermediet tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepas dan dikeluarkan dari sisi aktif yang digantikan secara bersamaan dengan molekul air. Intermediet tetrahedral kedua akhirnya

dibentuk dan menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang diregenerasi (Moran *et al.*, 1994).

Klasifikasi protease berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida dibagi menjadi endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase memutuskan ikatan peptida yang berada di dalam rantai protein sehingga dihasilkan peptida dan polipeptida, sedangkan eksopeptidase menguraikan protein dari ujung rantai sehingga dihasilkan satu asam amino dan sisa peptida. Kedua golongan protease tersebut masing-masing dapat dipilah lebih lanjut berdasarkan spesifisitas substratnya. Eksopeptidase yang memotong rantai polipeptida dari ujung karboksil bebas disebut sebagai karboksipeptidase dan yang memotong dari ujung asam amino dikenal sebagai aminopeptidase. Protease yang dapat menghidrolisis protein yang ada pada ujung amino atau karboksil diganti dengan petriol atau gugus asli dikelompokkan sebagai peptidase omega. Sebagian endopeptidase memotong ikatan peptida berdasarkan jenis asam amino tertentu atau yang berdekatan dengan situs pemotongan sebagian enzim memotong ikatan polipeptida secara acak (Ward, 1983).

Bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 menghasilkan enzim proteolitik berdasarkan penggunaan metode yang spesifik dan selektif. Bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 dikembangbiakan di dalam cawan petri menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). Penggunaan SMA disebabkan isolasi enzim proteolitik memerlukan media yang berprotein tinggi dan menggunakan uji kualitatif Indeks Proteolitik untuk menguji adanya enzim protease pada bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 seperti Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Hasil Uji Kualitatif Zona Bening (Herasari dkk., 2022)

Berdasarkan Gambar 1, isolat PK-IA171 memiliki diameter koloni bakteri sebesar 24,5 mm dan diameter zona bening sebesar 35,95 mm dengan Indeks Proteolitik (IP) sebesar 1,46. Pada isolat PK-IA172 memiliki diameter koloni bakteri sebesar 10,95 mm dan diameter zona bening sebesar 15,51 dengan Indeks Proteolitik (IP) sebesar 1,41. Isolat bakteri PK-IA171 memiliki nilai IP yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat bakteri PK-IA172, sehingga dipilih isolat bakteri PK-IA171 yang akan digunakan untuk langkah selanjutnya. Adanya zona bening ini disebabkan substrat pada media tersebut mengalami degradasi kasein oleh enzim yang dihasilkan bakteri (Herasari dkk., 2022).

Beberapa aplikasi enzim protease dalam bidang industri yaitu dalam proses pembuatan keju, pelunak daging (*tenderizing agent*), bir, penguat rasa, dan lain sebagainya. Enzim protease juga digunakan dalam industri kulit untuk membuat kulit lebih kenyal, sebagai bahan pembersih seperti detergen dan cairan pembersih lensa kontak (Rao *et al.*, 1998). Uhlig (1998) menjelaskan bahwa protease tanaman telah diterima di industri farmasi dan bioteknologi karena aktivitas mereka dalam berbagai suhu dan pH. Protease sistein seperti papain dan bromelain sangat berguna dalam industri makanan dan industri obat.

2.5. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim adalah salah satu cara untuk memurnikan enzim dengan cara memisahkan protein enzim dari protein jenis lain dan kontaminasi, pemurnian enzim berlangsung beberapa tahapan sebagai berikut:

1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Pemurnian protein (enzim) dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: kelarutan relatif protein karena pengaruh pH (pengendapan isoelektrik), polaritas (pengendapan dengan etanol atau aseton), atau fraksinasi dengan mengatur konsentrasi garam ammonium sulfat (Granner dkk., 2003). Pemisahan protein (enzim) dengan cara pengendapan fraksional menggunakan ammonium sulfat bertujuan meningkatkan kadar protein (kemurnian) dalam fraksi dari campuran kompleks (Davidson dan Sittman, 1999). Kemurnian enzim yang tinggi ditunjukkan oleh aktivitas spesifik yang tinggi. Ammonium sulfat sering digunakan dalam pengendapan protein untuk proses pemurnian melalui *salting out* karena memiliki kekuatan ionik yang cukup tinggi, tidak menimbulkan kerusakan pada protein (Matthews dkk., 2000), memiliki kelarutan tinggi dalam air, relatif murah (Wang, 2004), tidak berbahaya, dan memiliki efek penstabilan pada beberapa enzim (Chaplin, 2004).

Meningkatnya kekuatan ion akan menyebabkan kelarutan enzim semakin besar yang disebut dengan *salting in*. Jika kandungan ion semakin tinggi akan menyebabkan kelarutan enzim menurun dan mengendap yang disebut dengan *salting out*. Ammonium sulfat sering dipakai untuk mengendapkan enzim karena kelebihanannya, yaitu: kebanyakan enzim tahan terhadap garam tersebut (tidak terdenaturasi), memiliki kelarutan yang besar, mempunyai daya pengendapan yang cukup besar dan mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Perlakuan penambahan ammonium sulfat dilakukan dengan meningkatkan kejenuhan dari larutan enzim, dengan pembagian fraksi.

2. Dialisis

Dialisis adalah proses pemisahan molekul terlarut berdasarkan ukuran molekulnya menggunakan membran semi permeabel berdasarkan difusi partikel zat terlarut. Membran yang biasa digunakan adalah selofan yang berbentuk selang. Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Pada suhu tinggi laju difusi meningkat, tetapi sebagian besar protein dan enzim akan terdenaturasi. Proses dialisis harus dilakukan pada suhu 4-8°C dalam ruang dingin, karena protein dan enzim stabil pada suhu tersebut.

Selofan dipreparasi terlebih dahulu dengan memanaskan tabung dalam 200 mL larutan pencuci yang terdiri dari 10 mM NaHCO₃ dan 1 mM EDTA yang mendidih. Hasil pengendapan dengan *purification factor* dan *yield* terbaik dimasukkan ke dalam selofan, dimana satu ujung tabung selofan diikat terlebih dahulu. Selanjutnya, selofan yang sudah diisi dengan sampel diikat sampai rapat kedua ujungnya lalu dimasukkan ke dalam *buffer* 0,01 M dan didiamkan selama 24 jam serta diaduk secara perlahan dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C dan dilakukan penggantian *buffer* secara berkala sebanyak 6 sampai 8 kali (Amid *et al.*, 2014).

2.6. Uji Aktivitas Protease Metode Kunitz

Metode Kunitz (1971) yaitu sebuah metode yang menggunakan kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis kasein. Residu kasein yang tidak terhidrolisis akan diendapkan oleh *Trichloro Acetic Acid* (TCA). Metode ini didasarkan atas hidrolisis enzimatis oleh enzim yang teruji dari larutan substrat kasein 1% dalam *buffer* Tris-hcl 0,05 M selama 20 menit, dilanjutkan dengan menghentikan aktivitas enzim dan pengendapan dari substrat yang tidak terhidrolisis menggunakan pereaksi asam trikloroasetat (TCA) 10%. TCA bersifat asam, berfungsi untuk menghentikan aktivitas enzim, serta dapat menggumpalkan atau mengendapkan kasein. Menurut Lehninger (1993: 247) jika enzim direaksikan dengan asam kuat maka rantai polipeptidanya akan terpotong sehingga terjadi konformasi struktur yang dapat menyebabkan aktivitas katalitiknya hilang. Hasil hidrolisis terlarut kemudian ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri pada panjang

gelombang 280 nm, sebagai kontrol yaitu ekstrak enzim bromelin dari buah nanas yang dinonaktifkan dengan pemanasan selama 5 menit. Hasil analisis dinyatakan dalam satuan unit aktivitas protease yang didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 μmol material yang larut dalam pereaksi TCA 10% pada kondisi percobaan (Kurniawan, 2008).

2.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry. Metode ini merupakan salah satu metode pilihan untuk menentukan kadar protein dalam suatu bahan. Dalam keadaan basa, ion tembaga divalen (Cu^{2+}) membentuk suatu kompleks dengan ikatan peptida yang mereduksi Cu^{2+} menjadi tembaga monovalen Cu^+ . Ion Cu^+ dan gugus radikal dari tirosin, triptofan, dan sistein bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu membentuk senyawa kompleks yang berwarna. Pembentukan warna tersebut disebabkan karena adanya reaksi antara basa tembaga dengan sampel protein yang diuji. Intensitas warna yang terbentuk tergantung pada jumlah asam aromatik yang berbeda untuk setiap jenis protein (Bintang, 2010).

2.8. Senyawa Aditif

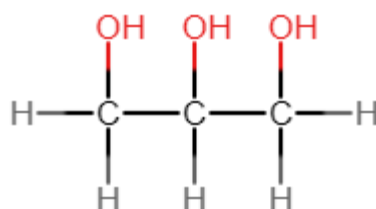
Senyawa aditif merupakan senyawa yang jika ditambahkan pada larutan enzim akan meningkatkan stabilitas struktur protein enzim tanpa mempengaruhi interaksi kovalen pada enzim. Pengaruh senyawa aditif terbatas pada interaksi non kovalen dengan enzim atau pada sistem pelarut enzim (Wulandari, 2008). Schwimmer (1981) menggolongkan zat aditif menjadi beberapa kelompok yaitu: substrat, senyawa hidrofilik, larutan garam dan gula, ion logam, anion, polianion, polikation, protein dan polimernya, inhibitor protease, senyawa pengkelat, anti buih, serta senyawa pereduksi dan antioksidan. Golongan alkohol polihidrat termasuk ke dalam senyawa hidrofilik. Senyawa hidrofilik akan menimbulkan hidrasi sehingga konformasi protein terjaga dari kemungkinan “membuka”, artinya konformasi aslinya cenderung tetap stabil. Senyawa ini sifatnya menarik air (hidrofilik) sehingga dapat menurunkan aktivitas air. Selain itu penambahan senyawa ini akan

meningkatkan interaksi hidrofilik di antara protein enzim sehingga diduga meningkatkan kestabilannya. Senyawa ini dapat bertindak sebagai penangkap atau pengikat radikal bebas sehingga mengurangi kemungkinan oksidasi terhadap enzim (Schwimmer, 1981).

2.9. Polioli (Alkohol Polihidrat)

Polioli merupakan senyawa polihidroksi yang dimanfaatkan untuk berbagai keperluan industri, yaitu sebagai bahan surfaktan dalam formulasi bahan makanan, kosmetik, dan dalam bidang farmasi seperti obat-obatan. Dalam industri polimer, senyawa polioli digunakan sebagai monomer pembentuk polimer, pemlastis, pemantap, pelunak, dan sebagai bahan aditif lainnya untuk pengolahan berbagai bahan polimer diantaranya PVC, polietilen, polipropilen, poliamida, poliester, dan poliuretan (Goddete dkk., 1993).

Gliserol adalah senyawa polioli yang memiliki 3 hidroksil. Senyawa ini bersifat hidrofilik dan higroskopik. Gliserol merupakan komponen yang menyusun berbagai macam lipid (gliserida), termasuk trigliserida. Gliserol dapat diperoleh dari proses saponifikasi dari lemak hewan, transesterifikasi pembuatan bahan bakar biodiesel dan proses epiklorohidrin. Gliserol dapat diproduksi dalam proses produksi biodiesel sebagai hasil samping dari reaksi transesterifikasi (Pratiwi dan Sinaga, 2017). Dalam bentuk murni merupakan senyawa yang tidak berbau, tidak berwarna, higroskopis dan berupa cairan kental yang berasa manis dengan titik leleh 180°C , titik didih 290°C , densitas sebesar $1,261\text{ g/cm}^3$, massa molekulnya $92,0982\text{ g/mol}$, dengan nama IUPAC propane-1,2,3-triol (Hart, 2003).



Gambar 2. Struktur Gliserol

Gliserol paling banyak digunakan pada industri makanan sebagai pemanis, bahan baku pembuatan obat di industri farmasi, serta beberapa produk perawatan pribadi seperti pelembab (humektan), kosmetik, pasta gigi, hingga kondisioner rambut. Gliserol juga digunakan dalam praktik medis untuk mengobati pasien dengan gangguan telinga bagian dalam atau sebagai agen osmotik pada pengobatan pasien penderita edema serebri atau pembengkakan otak.

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2023 sampai dengan Oktober 2023 dan bertempat di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu cawan petri, gelas piala, gelas ukur, tabung reaksi, *Erlenmeyer*, batang pengaduk, pipet tetes, spatula, autoklaf, *shaker incubator*, *aluminium foil*, bunsen, neraca analitik, jarum ose, kertas penutup, karet gelang, kantung selofan, plastik wrap, sumbat, *Laminar Air Flow*, sentrifius, *micropipet*, pH meter, *water bath* dan spektrofotometer UV-Vis Agilent Cary 100.

Bahan-bahan yang digunakan, yaitu isolat bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 koleksi Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Lampung, *Nutrient Agar* (NA), susu skim, kasein, NaCl, akuades, tirosin, *Bovine Serum Albumin* (BSA), amonium sulfat, reagen Folin-Ciocalteu, NaK-tartarat, NaOH, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan *buffer* fosfat.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

Peralatan gelas yang digunakan harus dicuci bersih kemudian dikeringkan. Sebelum disterilisasi, alat dibungkus dengan kertas dan disterilisasi ke dalam autoklaf bertekanan 1 atm dan bersuhu 121°C selama 15 menit. Alat yang telah disterilisasi dikeringkan dalam oven kurang lebih 2 jam.

b. Pembuatan Media Selektif Pertumbuhan Bakteri Proteolitik

Media SMA (*Skim Milk Agar*) terdiri dari 2,8% *Nutrient Agar* dan 1% susu skim. Panaskan media di atas *hot plate* hingga larut dan sterilisasi media dengan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit. Media dituangkan pada cawan secara aseptik, media didiamkan hingga mengeras dan siap digunakan

c. Pembuatan Media Produksi Protease

Media produksi protease dibuat dengan 10% susu skim yang dilarutkan dalam 1000 mL *buffer* fosfat kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

d. Pembuatan Pereaksi

Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan metode Kunitz. Adapun pereaksi yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Larutan kasein : 1 gram kasein dilarutkan dalam 100 mL *buffer* fosfat pH 7 pada penangas air.
2. Larutan TCA : 5 gram TCA dilarutkan dalam 100 mL akuades.
3. Larutan standar : Larutan tirosin dengan konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm.

Penentuan kadar protein ekstrak kasar enzim protease dilakukan dengan menggunakan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951).. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi Lowry. Pereaksi Lowry terdiri atas :

- Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 M.
- Pereaksi B : 5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 3 mL larutan NaK-tartarat 1%.
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.
- Pereaksi D : Reagen Folin-Ciocalteu diencerkan dengan akuades (1:1).
- Larutan Standar : Larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan konsentrasi 0, 100, 300, 500, 700, 900, dan 1100 ppm.

3.3.2. Peremajaan Isolat Bakteri

Peremajaan bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media NA miring dengan metode *streak* dan diinkubasi pada suhu ruang. Setelah 24 jam, semua stok bakteri disimpan dalam lemari es untuk persiapan perlakuan selanjutnya.

3.3.3. Pengukuran Aktivitas Protease

Aktivitas protease ditentukan dengan menggunakan metode Kunitz. Pada sampel, sebanyak 1 mL larutan kasein dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan enzim. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit dalam penangas air kemudian ditambahkan 3 mL TCA 5% secara tepat, dikocok dan diamkan kurang lebih 30 menit pada suhu ruang agar pengendapan sempurna. Endapan yang terbentuk disentrifugasi selama 20 menit. Pada kontrol, sebanyak 1 mL larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 3 mL larutan TCA 5% kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit dalam penangas air. Selanjutnya, ditambahkan larutan kasein sebanyak 1 mL, dikocok lalu didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi selama 20 menit untuk memisahkan filtrat dengan endapan yang terbentuk.

Kemudian filtrat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah asam amino (peptida sederhana) yang terbentuk dengan menggunakan kurva standar tirosin. Digunakan

kurva standar tirosin karena sebagian besar protein mengandung tirosin. Aktivitas protease dihitung dalam satuan protease unit per mL ekstrak enzim (Wahyuntari dan Hendrawati, 2012).

3.3.4. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Analisis ini dilakukan untuk memperoleh data tentang jumlah protein dalam tiap mL cairan enzim, yang akan dilakukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL larutan sampel yang akan diukur kandungannya ditambahkan dengan 0,9 mL akuades atau dimasukkan 5 mL pereaksi C dan dicampur hingga homogen, lalu dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan 0,5 mL pereaksi D dan dicampurkan hingga homogen, lalu didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar, setelah itu absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 750 nm. Untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai pembanding.

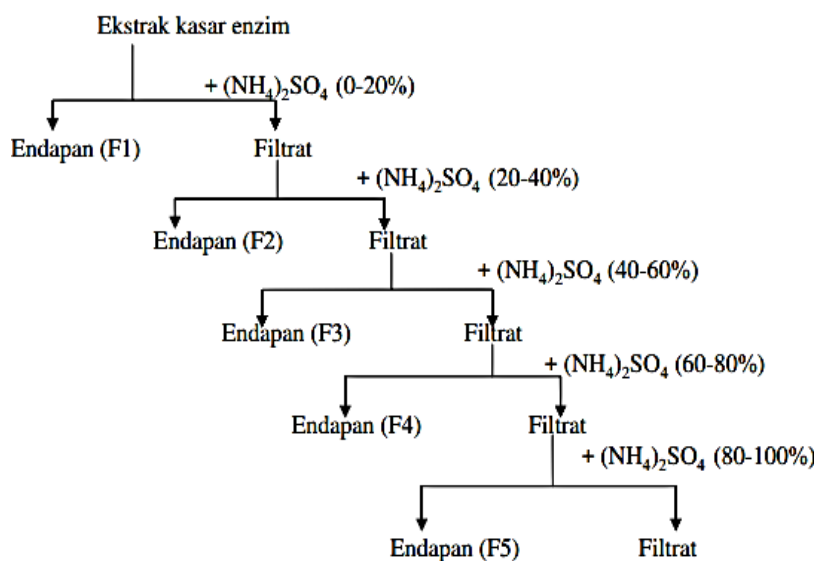
3.3.5. Produksi Enzim Protease

Produksi enzim diawali dengan pembuatan media inokulum dan selanjutnya, dengan media fermentasi. Media inokulum dan media fermentasi yang digunakan, yaitu media berkecukupan dengan 1% susu skim yang dilarutkan dengan larutan *buffer* fosfat 0,05 M dengan pH optimum yang telah diperoleh sebelumnya. Ditanamkan tiga ose bakteri *Klebsiella sp.* ke dalam media inokulum, lalu di-*shaker* selama 24 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm. Setelah 24 jam media inokulum terlihat berwarna kuning keruh. Selanjutnya proses fermentasi, media inokulum diambil sebanyak 10% dari volume media fermentasi, kemudian ditambahkan ke dalam media fermentasi dan di-*shaker* kembali pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm selama waktu optimum yakni 42 jam. Setelah itu disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 5000 rpm hingga didapatkan filtrat dan endapan. Filtrat atau ekstrak kasar enzim yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya dengan metode Kunitz dan kadar proteinnya dengan metode Lowry.

3.3.6. Pemurnian Enzim Protease

1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Supernatan berupa ekstrak enzim kasar yang diperoleh selanjutnya, diendapkan dengan fraksinasi amonium sulfat dengan berbagai tingkat kejenuhan, yaitu 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80%; dan 80-100%. Ekstrak enzim kasar diukur volumenya, ditambah x gram amonium sulfat sampai konsentrasi akhir 20% jenuh (b/v), kemudian disentrifugasi. Supernatan ditampung, sedangkan endapan yang tertinggal dibilas dengan *buffer* fosfat dan disimpan pada suhu 4°C sebagai fraksi endapan 20%. Hal yang sama dilakukan dengan konsentrasi akhir amonium sulfat 100% sehingga diperoleh fraksi endapan (FE-20%, FE-40%, FE-60%, FE-80% dan FE-100%). Fraksi-fraksi endapan tersebut kemudian didialisis. Adapun skema fraksinasi enzim dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Skema Proses Fraksinasi Enzim dengan Amonium Sulfat

2. Dialisis

Fraksi enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis menggunakan membran semipermeabel (kantong selofan). Fraksi tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan *buffer* fosfat 0,005 M pH 6 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama proses 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. Fraksi-fraksi hasil dialisis yang diperoleh diuji aktivitas dan kadar protein dan fraksi dengan aktivitas tertinggi dilakukan pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel.

3.3.9. Penambahan Gliserol

Gliserol ditambahkan pada enzim hasil pemurnian dengan konsentrasi 0,5 M; 1,0 M; dan 1,5 M dengan perbandingan 1:1. Gliserol yang digunakan pada penelitian ini adalah gliserol 85% dari Merck. Dalam pembuatan larutan gliserol dengan konsentrasi 0,5 M; 1,0 M; dan 1,5 M terlebih dahulu mengubah konsentrasi 85% menjadi bentuk molaritas (M) dengan rumus persamaan 1:

$$M = \frac{10 \times \rho \times \%}{mr} \dots\dots\dots (1)$$

Setelah itu baru digunakan rumus pengenceran untuk membuat larutan gliserol dengan konsentrasi 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M (Lampiran 7).

3.3.10. Karakterisasi Enzim Protease

a. Penentuan pH Optimum Aktivitas Enzim Protease

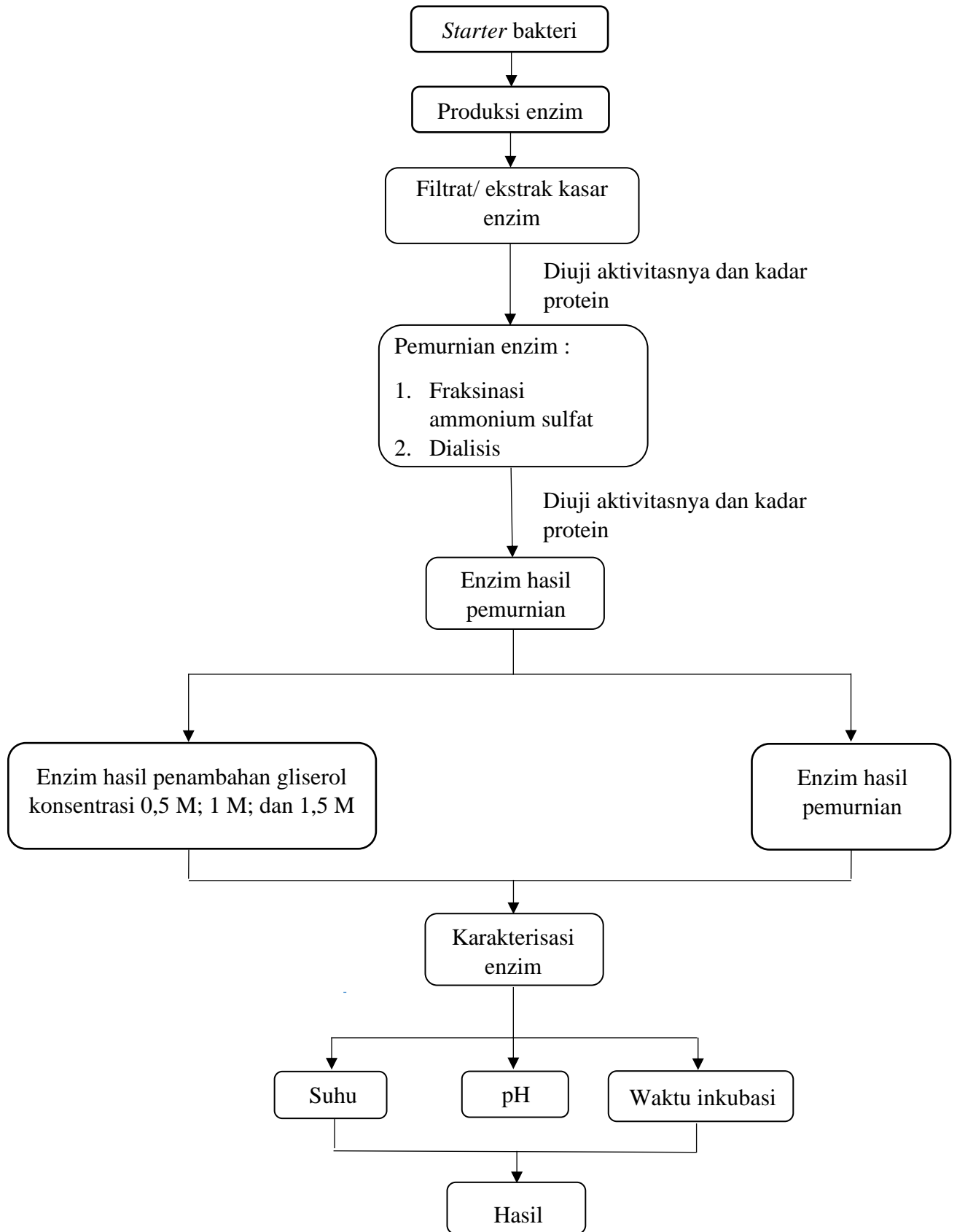
Penentuan pH optimum aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan gliserol dengan substrat kasein yang kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit dalam satu seri *buffer* fosfat 0,05 M, yaitu dengan pH 6; 7; dan 8. Selanjutnya, dilakukan pengukuran aktivitas enzim.

b. Penentuan Suhu Optimum Aktivitas Protease

Penentuan suhu optimum aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan gliserol dengan substrat kasein pada pH optimum selama 30 menit. Dengan variasi suhu uji 35; 40; 45; 50; 55; dan 60°C. Selanjutnya, dilakukan pengukuran aktivitas enzim..

c. Penentuan Waktu Inkubasi

Penentuan waktu inkubasi optimum aktivitas enzim diuji dengan cara enzim hasil pemurnian dan enzim hasil penambahan gliserol dengan substrat kasein pada suhu optimum dengan variasi waktu inkubasi 20, 30, 40, 50, dan 60 menit. Selanjutnya, dilakukan pengukuran aktivitas enzim.



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Penambahan gliserol mampu meningkatkan aktivitas unit enzim protease.
2. Kondisi optimum enzim protease dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 tanpa dan dengan penambahan gliserol tidak mengalami perubahan, yaitu pada pH 7, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 40 menit.
3. Peningkatan aktivitas unit enzim tertinggi pada suhu optimum yakni 50°C terjadi pada penambahan gliserol konsentrasi 1 M. Peningkatan aktivitas unit enzim tertinggi pada pH 7 terjadi pada penambahan gliserol konsentrasi 1 M. Sedangkan, pada waktu inkubasi optimum terjadi pada penambahan gliserol 1,5 M.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk peneliti selanjutnya dapat melakukan identifikasi lebih lanjut terhadap enzim protease dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 dengan melakukan peningkatan stabilitas termal dan pH, melalui modifikasi ataupun imobilisasi menggunakan poliol jenis lain selain gliserol atau dengan metode peningkatan stabilitas yang lain

DAFTAR PUSTAKA

- Amid, M., Manap, M. Y., and Zohdi, N. K. 2014. Purification and Characterization of Alkaline-Thermostable Protease Enzyme from Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Waste: A Potential Low Cost of the Enzyme. *Biomed Research International*.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga. Jakarta.
- Costa, S. A., Tzanov, T., Carneiro, A. F., Paar, A., Gubitz, G. M., and Paulo, A. C. 2001. Studies of Stabilization of Native Catalase Using Additives. *Journal Enzyme and Microbial Technol.* 30(3): 387-391.
- Fauziah, N. F., Herasari, D., dan Laila, A. 2012. Studi Pengaruh Penambahan Gliserol Dan Sorbitol Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari *Actinomyces* ANL4 2b-3. Prosiding SNSMAIP III-2012. 515-520.
- Goddete, D.W., C. Terri, F.L. Beth, L. Maria, R.M. Jonathan, P. Christian, B.R. Robert, S.Y. Shioh, and C.R. Wilson. 1993. Strategy and implementation of a system for protein engineering. *Journal of Biochemistry*. 28: 41-54.
- Hart, H. 2003. *Kimia Organik*. Erlangga. Jakarta.
- Herasari, D., Salsabilla, A. R., Parwathi, I., Laila, A., Mulyono, dan Suharso. 2022. Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Klebsiella Sp.* Indigen Tanah Tercemar Minyak di Bandar Lampung. *Journal Analit: Analytical and Environmental Chemistr.*7(1): 35-53
- Hodgson, C. J. 1994. *The Scale Insect Family Coccidae: An Identification Manual to Genera*. CAB International Institute of Entomology. Wallingford.
- Karp, Gerald. 2010. *Cell And Molecular Biology: Concept And Experiments 6th edition*. Amerika. John Wiley & Sons.
- Kazan, D., H. Ertan dan A. Erarslan. 1997. Stabilization Of *Escherichia Coli* Penicillin G Acylase Againsts Thermal Inactivation By Cross-Linking With Dextran Dialdehyde Polymers. *Applied. Microbiol Biotechnol.* 48: 191-197.
- Kurniawan, F. B., dan Indra, T. S. 2018. *Bakteriologi*. EGC. Jakarta.

- Lehninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. Thenawidjaja M, Penerjemah. Erlangga. Jakarta.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1) : 265–275.
- Mahajan, R. T. dan Shamnkant, B. B., 2010, Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review. *India J. PHarm., Research.* 3(9): 2048-2068.
- Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Horton, H. R., Ochs, R. S., dan Rawn, J. D. 1994. *Biochemistry Second Ed*. Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River.
- Mosan, P. and D. Combes. 1984. *Stabilization of enzyme activity. The Proceedings of Biotechnology Europe Online*. Online Publication Ltd. London
- Motyán, J. A., Ferenc, T., and Jozsef, T. 2013. Research Applications of Proteolytic Enzymes In Molecular Biology. *J. Biomol.* 3(4): 923-942.
- Nanik, S., Yandri A. S., dan Hadi, S. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Protease dari *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia Menggunakan Sitrakonat Anhidrida. *Jurnal Analis Kesehatan.* 5(1): 475-482.
- Nelson, D. L., dan Cox, M. M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman. New York.
- Nugraha, S., dan Maulina, R. 2013. *Kamus Lengkap Biologi*. Karina. Surabaya.
- Nuzulah, Yuyun F., dan Suharti. 2018. Initial Characterization of Alkaline Protease from *Klebsiella Sp.* Isolatd from Chicken Feces (Poster). *Jurnal Kimia Riset.* 3(2): 122-130.
- Poliana, J., and MacCabe, A. P. 2007. *Industrial Enzyme: Structure, Function, and Applications*. Springer. Dordrecht
- Pratiwi, E., dan Sinaga, F, M. 2017. Konversi Gliserol dari Biodiesel Minyak Jelantah dengan Katalisator KOH. *Jurnal Chemurgy.* 1(1): 9-15.
- Rao M. M., Tanksale A. M., Gatge M.S., and DespHande VV. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 62(3):597-635.
- Razzaq A. Sahmsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, Ashraf M. 2019. Microbial Proteases Applications. *J. Front Bioeng Biotech.* 7: 110.
- Reid, G., and Wong P. 2005. *Soil Bacteria Basic*. Department of Primary Industries. State of New South Wales.

- Riawati, s., dan Yandri. 2012. Studi Pengaruh Penambahan Gliserol Terhadap Stabilitas Enzim Selulase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Prosiding SNSMAIP III-2012. 526-531.
- Salsabilla, A. R. 2021. Pengaruh Variasi Ion Logam dan Senyawa Inhibitor Terhadap Aktivitas Protease Dari Bakteri *Klebsiella sp.* Isolat Tanah Tercemar. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Schwimmer, S. 1981. *Source Book of Food Enzymology*. AVI Publishing Co., Inc. Connecticut.
- Singh R., Anshumali M., Manoj K., and Praveen K. M. 2015. Microbial Proteases In Commercial Applications. *J. Front Bioeng Biotech*. 7: 110.
- Soedarto. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. CV Sagung Seto. Jakarta.
- Soemitro, S. 2005. Pengaruh Modifikasi Kimiawi Selektif Terhadap Kestabilan α -amilase dari *Saccharomyces fibuligera*. *J. Bionatura*. 7(3): 259-273
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Dirjen DIKTI, PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Sutandi C. 2003. *Analisis Potensi Enzim Lokal*. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wahyuntari, B., and Hendrawati, H. 2012. Properties of an Extracellular Protease of *Bacillus Megaterium* DSM 319 as Depilating Aid of Hides. *Microbiology Indonesia*. 6(2): Hal. 77-82.
- Wulandari, P. 2008. Studi Pengaruh Penambahan Poliol Terhadap Stabilitas Termal Enzim α -amilase dari *Rhizopus oryzae*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Yandri, D. Herasari, T. Suhartati, S. Hadi (2009), The effect of chemical modification on the thermal stability of protease from local isolate bacteria, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, *Nature and Science*, 7 (2): 68-75.
- Yestikasari, M. 2022. Pengaruh Penambahan Gliserol Terhadap Stabilitas Enzim Protease dari *Aspergillus fumigatus*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.