

**PROFIL PERTUMBUHAN DAN AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DARI  
ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK SUMBER AIR PANAS CURUP,  
BENGKULU**

**SKRIPSI SARJANA BIOLOGI**



**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS ANDALAS**  
**PADANG**  
**2022**

PROFIL PERTUMBUHAN DAN AKTIVITAS PROTEASE DARI ISOLAT  
BAKTERI TERMOFILIK SUMBER AIR PANAS CURUP, BENGKULU

Skripsi

Skripsi ini diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
Sarjana Sains Bidang Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan  
Alam, Universitas Andalas, Padang

Oleh:

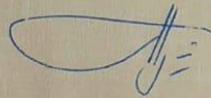
Siti Aisyah Jayanti

1710422011

Padang, 28 Desember 2022

Disetujui Oleh:

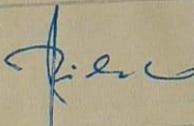
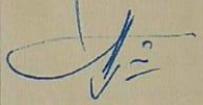
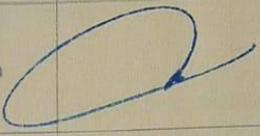
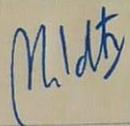
Pembimbing



Dr. Anthoni Agustien

NID. 10020012100011001  
NIS. 17020012100011001

Skripsi ini dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Biologi, Fakultas  
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang pada  
Rabu, 28 Desember 2022

No.	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1.	Dr.phil.nat. Periadnadi	Ketua	
2.	Dr. Anthoni Agustien	Sekretaris	
3.	Suwirmen M.S	Anggota	
4.	Dr. Mildawati	Anggota	

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN

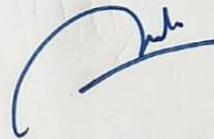
Dengan ini saya menyatakan bahwa:

Skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik sarjana baik di Universitas Andalas maupun diperguruan tinggi lain. Skripsi ini adalah murni gagasan rumusan dan penelitian saya sendiri kecuali Dosen Pembimbing.

Dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik sesuai dengan aturan yang berlaku.

Padang, 28 Desember 2022  
Yang membuat pernyataan



Siti Aisyah Jayanti  
1710422011

*“Dia mengajarkan manusia apa-apa yang tidak diketahuinya”*

Q.S Al-‘Ala: 5

Allah memberikan kita petunjuk agar kita dapat mengetahui ilmu pengetahuan dari yang awalnya tidak tahu hingga menjadi tahu.

Alhamdulillah Wasyukurillah, berakhir sudah per drama-an di dunia perkuliahan ini.

Skripsi ini saya persembahkan untuk Ayah tercinta Jainani dan Ibu tersayang Musfaryenti. Serta kakak saya Siti Hanifah Jayanti dan adik-adik saya Muhammad Salim Jailani, Siti Azizah Jayanti dan Akbar Ghani Jailani yang telah menjadi support system, penyemangat dan mengerti posisi saya. Terimakasih buat orang spesial yang saat ini sedang melanjutkan study di Turki sebagai salah satu pemberi motivasi dalam hidup saya. Terimakasih juga buat sahabat-sahabat yang suka menegur dan menyindir saya untuk segera wisuda serta bersedia memenuhi mood saya untuk healing dadakan. Dan juga terimakasih banyak kepada rekan-rekan seperjuangan selama kuliah, organisasi dan skripsi.

Semoga Allah selalu memberkahi jalan hidup kita hingga bertemu kembali di Jannah-Nya



Siti Aisyah Jayanti

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas berkat rahmat dan hidayah Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Sarjana pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang. Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang berjudul “Profil Pertumbuhan Dan Aktivitas Enzim Protease Dari Isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Curup, Bengkulu”.

Dengan selesainya skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Anthoni Agustien selaku dosen pembimbing yang telah memberikan petunjuk, membimbing dan dorongan kepada penulis mulai dari awal penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi ini.

Ucapan terimakasih juga ditujukan kepada:

1. Bapak Dr. Wilson Novarino selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.
2. Bapak Dr.phil.nat Periadnadi, Bapak Suwirmen M.S dan Ibu Dr. Mildawati selaku penguji yang telah memberikan saran dan arahan untuk penyempurnaan skripsi ini.
3. Bapak Prof. Dr. Syamsuardi selaku Penasehat Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini.
4. Bapak Dr. Anthoni Agustien selaku kepala Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.
5. Bapak Prof. Dr. H. Akmal Djamaan Ms,Apt. selaku kepala Laboratorium Bioteknologi Biota Sumatera, Universitas Andalas Padang.
6. Seluruh dosen serta karyawan dan karyawanwati Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

7. Serta semua pihak yang telah berjasa dalam pelaksanaan penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu perratu.

Semoga segala bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis menjadi amal soleh dan mendapat balasan dari Allah SWT. Akhir kata penulis mengharapkan skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan dapat dikembangkan untuk penelitian selanjutnya.

Padang, 28 Desember 2022

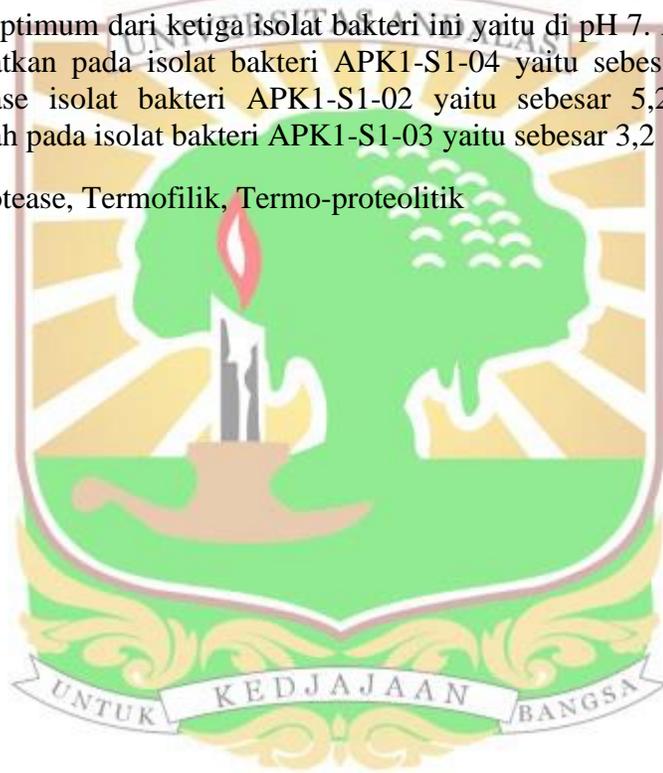


Penulis

## ABSTRAK

Bakteri thermo-proteolitik merupakan kelompok bakteri yang tahan terhadap suhu panas dan penghasil enzim protease. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil pertumbuhan dan aktivitas enzim protease dari sumber air panas Curup, Bengkulu yang dilakukan di Laboratorium Biota Sumatera dari bulan Januari – Juli 2022. Isolat bakteri yang digunakan dari koleksi isolat bakteri termofilik asal Sumber Air Panas Curup Bengkulu yang terdapat di laboratorium Bioteknologi, SDH Unand. Metodologi penelitian ini menggunakan metode eksperimental, dengan parameter profil pertumbuhan, pengujian suhu, pH dan aktivitas enzim protease. Hasil dari penelitian ini yaitu profil pertumbuhan dari ketiga isolat sama-sama optimum pada jam ke-7, Suhu tertinggi isolat bakteri APK1-S1-02 dan APK1-S1-03 dalam menghasilkan protease adalah di suhu 80 °C dan isolat bakteri APK1-S1-04 juga di suhu 80 °C dengan pH optimum dari ketiga isolat bakteri ini yaitu di pH 7. Aktivitas protease tertinggi didapatkan pada isolat bakteri APK1-S1-04 yaitu sebesar 6,9 U/ml, lalu aktivitas protease isolat bakteri APK1-S1-02 yaitu sebesar 5,2 U/ml, aktivitas protease terendah pada isolat bakteri APK1-S1-03 yaitu sebesar 3,2 U/ml.

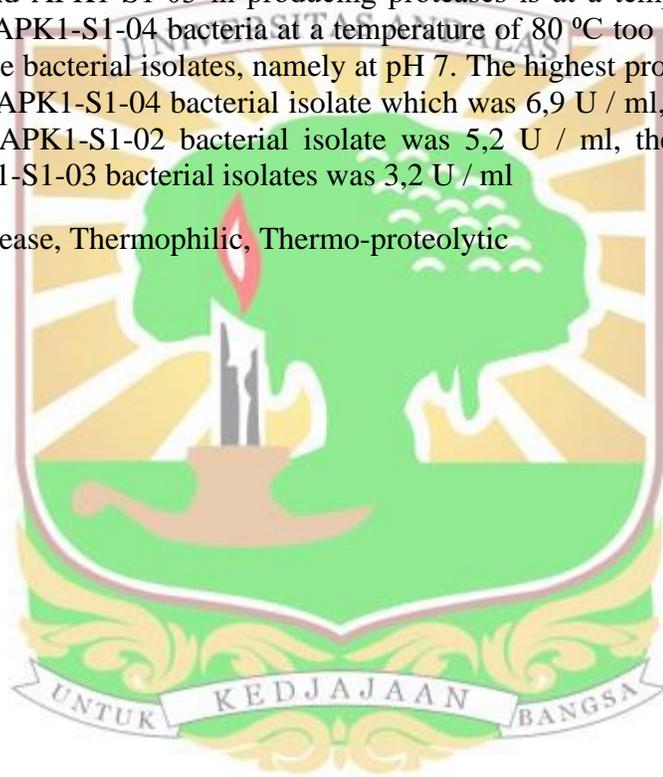
Kata kunci : Protease, Termofilik, Thermo-proteolitik



## ABSTRACT

Thermo-proteolytic bacteria are a group of bacteria that are resistant to heat temperatures and produce protease enzymes. This study aims to determine the growth profile and activity of protease enzymes from curup hot springs, Bengkulu which was carried out at the Sumatra Biota Laboratory from January – July 2022. Bacterial isolates used from the collection of thermophilic bacterial isolates from Curup Bengkulu Hot Springs found in the Biotechnology laboratory, SDH Unand. The methodology of this study uses an experimental method, with the parameters of the growth profile, temperature testing, ph and enzyme activity proved by related methods. The results of this study are that the growth profiles of the three isolates are equally optimum at the 7th hour, the highest temperature of the bacterial isolates APK1-S1-02 and APK1-S1-03 in producing proteases is at a temperature of 80 °C and isolates of APK1-S1-04 bacteria at a temperature of 80 °C too with the optimum pH of these three bacterial isolates, namely at pH 7. The highest protease activity was obtained in the APK1-S1-04 bacterial isolate which was 6,9 U / ml, then the protease activity of the APK1-S1-02 bacterial isolate was 5,2 U / ml, the lowest protease activity in APK1-S1-03 bacterial isolates was 3,2 U / ml

Key word : Protease, Thermophilic, Thermo-proteolytic



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Mikroorganisme Termofilik .....	4
2.2 Habitat Mikroorganisme Termofilik.....	7
2.3 Adaptasi Mikroorganisme Termofilik.....	8
2.4 Enzim Protease .....	8
2.5 Klasifikasi Enzim Protease .....	10
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>11</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	11
3.2 Metode Penelitian .....	11
3.3 Alat dan Bahan .....	11
3.4 Cara Kerja.....	11
3.4.1 Tahap Persiapan .....	11

3.4.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	11
3.4.1.2 Pembuatan Medium SMA .....	12
3.4.1.3 Pembuatan Medium NA .....	12
3.4.1.4 Pembuatan Medium Produksi Protease .....	12
3.4.2 Tahap Pelaksanaan .....	12
3.4.2.1 Peremajaan Bakteri Termofilik .....	12
3.4.2.2 Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Protease .....	12
3.4.2.3 Profil Pertumbuhan Bakteri Termofilik Penghasil Protease ..	13
3.4.2.4 Pengaruh Suhu Terhadap Pertumbuhan Bakteri Termo-Protease .....	13
3.4.2.5 Pengaruh pH Terhadap Pertumbuhan Bakteri Termo-Protease .....	14
3.4.2.6 Pengujian Aktivitas Enzim Protease .....	14
3.4.3 Analisis Data .....	14
<b>BAB IV. HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>15</b>
4.1 Skrining Bakteri Termo-Proteolitik .....	15
4.2 Profil Pertumbuhan Bakteri Termo-Proteolitik .....	17
4.3 Pengaruh Suhu Terhadap Pertumbuhan Bakteri Termo-Proteolitik .....	19
4.4 Pengaruh pH Terhadap Pertumbuhan Bakteri Termo-Proteolitik .....	20
4.5 Pengujian Aktivitas Protease .....	22
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>23</b>
5.1 Kesimpulan .....	23
5.2 Saran .....	23
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>24</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>26</b>

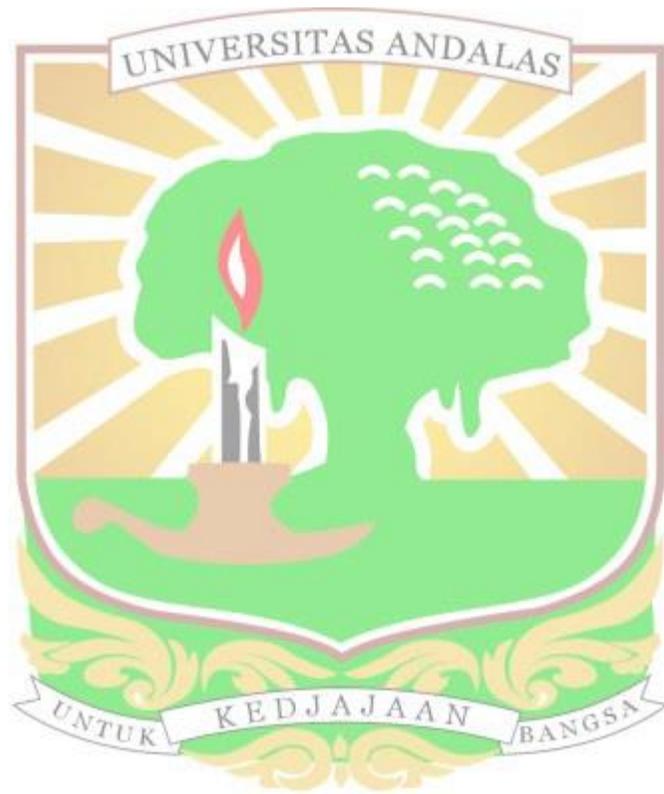
## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Rata-rata Indeks Proteolitik (IP) dari Isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Curup, Bengkulu .....	15
2. Aktivitas Protease dari Ketiga Isolat Bakteri Termofilik.....	22



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Profil Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Termo-Proteolitik.....	17
2. Histogram Pengaruh Suhu terhadap Isolat Bakteri Termo-Proteolitik .....	19
3. Histogram Pengaruh pH terhadap Isolat Bakteri Termo-Proteolitik.....	20



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Gambar Hasil Skrining Bakteri Termofilik .....	26
1.1 Isolat Bakteri degan Nilai Indeks Proteolitik Tinggi.....	26
1.2 Isolat Bakteri degan Nilai Indeks Proteolitik Rendah .....	27
2. Perhitungan Indeks Proteolitik.....	28
3. Profil Pertumbuhan Bakteri Termo-Proteolitik.....	29
4. Pengujian Beberapa Suhu pada Isolat Bakteri Termo-Proteolitik .....	29
5. Pengujian Beberapa pH pada Isolat Bakteri Termo-Proteolitik.....	29
6. Nilai Optical Densiti (OD) Enzim Protease .....	30
7. Perhitungan Aktivitas Enzim Protease.....	30
7.1 Data Nilai Absorbansi Sampel.....	30
7.2 Perhitungan Aktivitas Enzim Protease.....	31



# BAB I. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Dewasa ini perkembangan bioteknologi maju sangat pesat. Salah satu produk bioteknologi yang menjadi primadona saat ini adalah enzim. Enzim merupakan biokatalis yang beragam bentuk, ukuran, sifat, dan peranannya dalam sel. Berdasarkan peranan enzim dalam sel hewan, tumbuhan dan mikroba, maka enzim berperan dalam setiap reaksi biokimia, yaitu mulai dari konversi energi, metabolisme makanan, mekanisme pertahanan sel, komunikasi antar sel hingga konversi sifat-sifat keturunan. Karena itulah enzim mempunyai potensi bioteknologi yang tinggi dan dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri (Suhartono, 2000).

Protease merupakan salah satu kelompok yang paling penting dari enzim industri yang secara luas digunakan dalam industri makanan, farmasi, hidrolisis protein, detergen, pembuatan keju, bir, fotografi, baking, industri kulit juga digunakan dalam makanan hewan dan manusia untuk membantu proses bantu pencernaan (Synowiecki, 2010; Dias *et al*, 2008). Sekitar 75% dari penjualan dunia aplikasi enzim dalam dunia industri adalah enzim hidrolitik, yang mana sekitar 60% adalah enzim proteolitik (Ningthoujam dan Kshetri, 2010).

Sumber protease yang paling banyak digunakan adalah enzim yang berasal dari bakteri dibanding yang lainnya, karena bakteri dianggap lebih menguntungkan sebab pertumbuhannya cepat, mudah diatur, dapat tumbuh dalam substrat yang murah, dapat diproduksi dalam skala besar dan mutu yang lebih seragam (Agustien *et al*, 2010).

Pemilihan enzim yang berasal dari mikroba memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan yang berasal dari hewan maupun tumbuhan. Salah satu keuntungan yang didapatkan adalah pertumbuhan enzim akan lebih cepat terjadi pada bakteri karena selnya cepat mengalami pembelahan dan produksi akan sel akan lebih mudah untuk ditingkatkan apabila dibutuhkan dalam jumlah yang besar serta waktu produksi enzim yang dibutuhkan akan lebih pendek. Bakteri penghasil enzim protease

yang dapat bertahan pada suhu tinggi didapatkan dari mikroorganisme termofilik, karena faktor utama yang membuat enzim cepat mengalami kerusakan yaitu suhu (Suhartono, 2000). Bakteri yang sering digunakan dalam produksi enzim yaitu bakteri termofilik karena bakteri termofilik mengandung protein tahan panas dan tahan denaturasi sehingga mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang ekstrim (Kumar dan Nussinov, 2001).

Pengisolasian bakteri termofilik dilakukan dari berbagai habitat dengan tujuan penggunaan bakteri dan enzim termostabil yang dihasilkan oleh bakteri untuk diterapkan dalam dunia industri semakin intensif. Penggunaan enzim termostabil pada beberapa aplikasi sangat efektif dan menguntungkan, seperti dapat meningkatkan kecepatan reaksi, meningkatkan kelarutan reaktan dan produk-produk non volatil serta mengurangi kontaminasi dari mikroba mesofilik (Martin *et al.*, 2007).

Bakteri termofilik merupakan kelompok bakteri yang beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang bersuhu tinggi, yaitu dengan suhu berkisar 45- 90 °C. Habitat alami bakteri termofilik tersebar luas di daerah permukaan bumi, diantaranya pada sumber-sumber air panas, kawah gunung berapi atau daerah vulkanik (Labeda, 1990). Lingkungan alaminya terbentuk akibat aktivitas vulkanik atau perpindahan kerak bumi pada saat gempa tektonik. Fenomena geologi tersebut menghasilkan kawah air panas yang biasanya memiliki pH netral (Edward, 1990).

Sumber air panas merupakan media pertumbuhan yang cocok bagi bakteri termofilik. Salah satu sumber air panas yang berpotensi untuk diteliti salah satunya yaitu sumber air panas yang berada di Curup, Bengkulu. Hasil penelitian pendahuluan Agustien (2020) telah didapatkan sejumlah 27 isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Curup, Bengkulu. Karakter lingkungan daerah penghasil bakteri termofilik ini cukup unik dengan suhu kisaran antara 45 – 80 °C dan pH antara 5,53 - 6,56. Hal ini membuktikan bahwa bakteri termofilik yang didapatkan di lokasi ini dapat hidup di pH asam. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai “Profil Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Protease dari isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Curup, Bengkulu”.

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Bagaimanakah profil pertumbuhan bakteri termofilik yang didapatkan dari bakteri termofilik sumber air panas Curup, Bengkulu?
2. Bagaimanakah efek suhu dan pH terhadap pertumbuhan bakteri termofilik sumber air panas Curup, Bengkulu?
3. Bagaimana aktifitas protease yang dihasilkan dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Curup, Bengkulu?

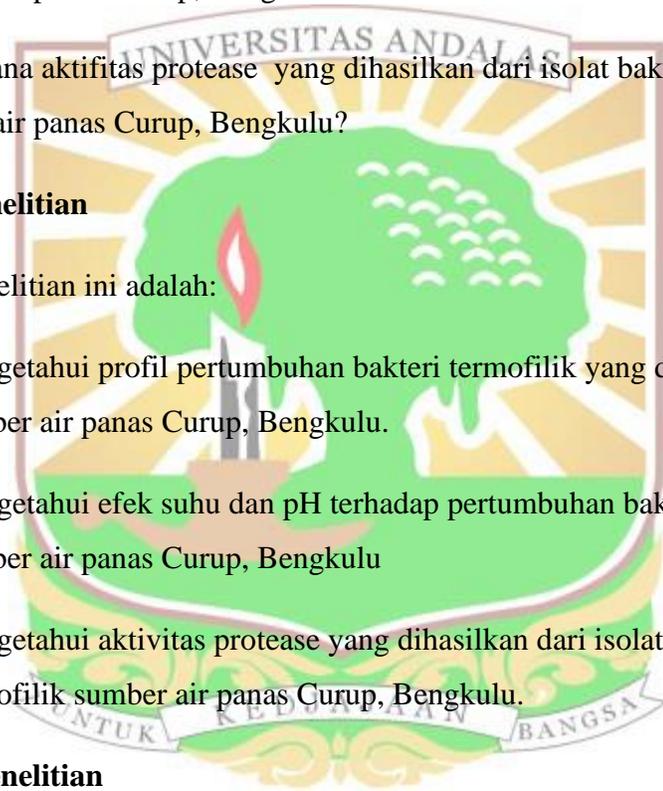
## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui profil pertumbuhan bakteri termofilik yang didapatkan dari sumber air panas Curup, Bengkulu.
2. Mengetahui efek suhu dan pH terhadap pertumbuhan bakteri termofilik sumber air panas Curup, Bengkulu
3. Mengetahui aktivitas protease yang dihasilkan dari isolat bakteri termofilik sumber air panas Curup, Bengkulu.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah terbaru mengenai profil pertumbuhan bakteri dan aktivitas protease dari isolat bakteri termofilik yang didapatkan pada sumber air panas Curup, Bengkulu.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mikroorganisme Termofilik

Mikroba termofilik adalah mikroba yang tumbuh optimal pada suhu lebih tinggi dari 45°C. Habitat bakteri termofilik adalah pada tempat-tempat yang mempunyai kondisi lingkungan yang panas. Mikroba termofilik dapat hidup pada lingkungan yang ekstrim. Beberapa habitat ekstrim bagi bakteri termofilik diantaranya yaitu sumber air panas, kawah gunung berapi, dan di celah hidrotermal kedalaman air laut. Celah tersebut merupakan rekahan permukaan bumi di bawah laut tempat magma merembes dan memanaskan air. Bakteri termofilik pertama kali ditemukan pada tahun 1960 oleh Thomas Brock di sumber air panas Yellow Stone. Termofilik bervariasi dalam persyaratan panas, dengan kisaran umum pertumbuhan yaitu pada suhu 45-80°C. Pada sebagian besar eukariotik tidak dapat bertahan di atas suhu 80°C dan 110°C, saat ini dianggap dapat membatasi kinerja enzim dan struktur sel (Kathleen, 2005).

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang paling penting untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri (Zubaidah, 2000). Suhu lingkungan sangat mempengaruhi mikroorganisme, seperti halnya untuk semua organisme yang lain. Mikroorganisme biasanya rentan terhadap suhu yang bervariasi pada lingkungan eksternal. Faktor paling penting yang mempengaruhi perkembangannya adalah pengaruh suhu pada pertumbuhan, dimana sensitivitas temperatur bereaksi pada enzim katalis. Setiap enzim memiliki batas suhu agar dapat berfungsi optimal. Pada suhu dibawah optimal, proses katalik enzim dapat terhenti. Kenaikan suhu dari suhu

rendah membuat tingkat kenaikan katalisis yang teramati sama untuk suhu optimal. Kecepatan reaksi kira-kira akan berlipat ganda untuk setiap kenaikan suhu 10°C (Prescott *et al.*, 2008).

Menurut Jawetz *et al.*, (2008) jenis bakteri berdasarkan suhu terbagi tiga yaitu bakteri psikofilik dengan suhu pertumbuhannya antara -5 s.d 30°C dan suhu optimumnya 10 s.d 20°C. Bakteri mesofilik memiliki suhu pertumbuhan antara 10 s.d 45°C dengan suhu optimumnya 20 s.d 40°C dan bakteri termofilik dengan suhu pertumbuhan antara 25-80°C dengan suhu optimum kisaran suhu 50-60°C. Namun menurut pendapat Prescott *et al.*, (2008) mikroorganisme termofilik tumbuh baik pada suhu 55 s.d 85°C. Pertumbuhan minimum mikroorganisme ini yaitu pada suhu 45°C dan suhu optimumnya antara suhu 55 s.d 65°C. Sebagian besar mikroorganisme yang hidup di lingkungan ini adalah prokariota meskipun masih ditemukan protista fotosintetik dan jamur termofilik.

Sel-sel mikroba tidak dapat mengontrol suhu tubuh mereka dan karena itulah mikroba menganggap suhu lingkungan sebagai habitat alami mereka. Kelangsungan hidup mikroba tergantung pada kemampuan beradaptasi pada berbagai macam variasi suhu yang ditemui di habitatnya. Suhu kisaran untuk pertumbuhan mikroba dapat dinyatakan sebagai tiga suhu kardinal. Suhu minimum adalah suhu terendah yang memungkinkan untuk metabolisme mikroba dan dibawah dari suhu tersebut aktivitasnya terhambat. Suhu maksimum adalah suhu tertinggi dimana pertumbuhan dan metabolisme dapat dilanjutkan. Jika suhu naik diatas suhu maksimum, pertumbuhan mikroba akan terhenti, namun jika terus naik melampaui titik tersebut,

enzim dan asam nukleat akhirnya akan menjadi tidak aktif secara permanen atau dikenal sebagai denaturasi, dan sel akan mati. Berdasarkan hal tersebut diketahui mengapa di suhu panas enzim dapat bekerja dengan baik sebagai agen untuk mengendalikan mikroba. Suhu optimum mencakup rentang kecil, menengah antara minimum yang menunjukkan tingkat tercepat dari pertumbuhan dan metabolisme (Kathleen, 2005).

Pada sebagian besar mikroorganisme pertumbuhan mencapai optimal pada suhu sekitar 20-45°C yang disebut mesofilik. Lain halnya untuk mikroba yang hidup di suhu termofilik yang telah menyesuaikan kemampuan tubuhnya untuk bertahan, tetapi juga berkembang pada temperatur yang lebih tinggi. Mikroba termofilik akan mampu tumbuh dalam rentangan suhu sekitar 40-80°C dengan pertumbuhan optimal pada kisaran suhu 50°C - 65°C. Mikroba termofilik ekstrim memiliki suhu optimal lebih dari termofil dan dapat bertoleransi pada suhu lebih dari 100°C. Pada tahun 2003, anggota dari kelompok bakteri primitif Archaea, diketahui dapat tumbuh pada suhu 121°C, hal tersebut merupakan sebuah rekor dunia baru. Psicrofil menempati suhu ekstrim yang lain. Mereka dapat tumbuh pada suhu 0°C dengan pertumbuhan optimalnya terjadi pada suhu 15°C atau dibawahnya. Organisme tersebut tidak dapat tumbuh pada suhu diatas 25°C atau lebih (Stuart, 2005). Beberapa enzim termostabil mempunyai susunan asam amino yang sedikit berbeda dengan enzim yang sama dari bakteri mesofilik, yaitu banyak mengandung asam amino yang bersifat hidrofobik, salah satunya yaitu enzim protease (Mardigan, Martinko, dan Parker, 2000).

## 2.2 Habitat Mikroorganisme Termofilik

Bakteri termofilik pertama kali diisolasi tahun 1879 oleh Miquel yang menemukan bakteri yang mampu berkembang pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  ( $162^{\circ}\text{F}$ ). Miquel menemukan bakteri ini pada tanah, debu, kotoran badan, tempat pembuangan limbah, dan lumpur sungai. Tidak lama kemudian, ditemukan varietas bakteri termofilik pada tanah yang tumbuh subur pada temperatur tinggi tetapi tidak dapat tumbuh pada suhu kamar. Bakteri ini ditemukan di gurun pasir Sahara, tetapi tidak di tanah yang memiliki temperatur dingin. Pada perkebunan yang mengandung pupuk terdapat 1-10% bakteri termofilik, sementara tanah lapang yang luas hanya mengandung 0,25% atau kurang. Tanah yang tidak ditumbuhi tanaman kemungkinan sama sekali tidak terdapat bakteri termofilik (Prasetyo, 2006).

Sebagian bakteri termofilik ditemukan dalam sumber air panas dan lingkungan termal lainnya. Air mendidih meluap melalui tepi mata air dan mengalir jauh dari sumbernya, air tersebut secara bertahap mendingin, sehingga mengakibatkan gradient suhu di sumber air panas. Berbagai mikroorganisme tumbuh, spesies berbeda tumbuh dengan rentang waktu berbeda seiring dengan gradient suhu tersebut. Distribusi spesies di sepanjang gradient suhu tersebut dapat dipelajari dan dengan meneliti sumber air panas dan habitat termal lainnya pada temperatur berbeda di seluruh dunia, telah memungkinkan untuk menentukan batas temperatur maksimal untuk setiap jenis organisme. Informasi ini dapat disimpulkan bahwa (1) organisme prokariotik dapat bertahan di suhu yang jauh lebih tinggi dari pada eukariotik, (2) kelompok paling termofilik dari semua prokariota adalah jenis *Archae* (3) organisme

*nonphotothropic* dapat tumbuh disuhu yang lebih tinggi dari pada organisme *photothropic* (Mardigan *et al.*, 2000).

### **2.3 Adaptasi Mikroorganisme Termofilik**

Mikroorganisme termofilik telah dipelajari secara intensif dalam pengaruhnya untuk mekanisme dimana organisme ini tidak hanya bertahan, tetapi juga menyukai suhu yang lebih tinggi untuk pertumbuhannya. Secara kimia perbedaan lipid ditemukan di mikroorganisme termofilik. Organisme termofilik mengandung lipid dengan titik lebur yang lebih tinggi dari yang ditemukan pada mesofil. Komposisi membran lipid pada organisme termofilik dibedakan dengan presentase lebih tinggi (30-40%) dari asam jenuh dibandingkan dengan spesies mesofilik dan psikofilik (Albert, 2002).

Selain enzim dan makromolekul lain di dalam sel, membran sitoplasma dari organisme termofilik dan hipertermofilik harus tahan terhadap panas. Psikofilik memiliki membran lipid kaya asam lemak tak jenuh, sehingga membuat membran setengah cair fungsional pada suhu rendah. Termofilik biasanya memiliki lipid yang kaya akan asam lemak jenuh. Hal tersebut memungkinkan membran untuk tetap stabil dan fungsional pada suhu tinggi. Asam lemak jenuh membentuk lingkungan hidrofobik kuat dari pada asam lemak tak jenuh yang membantu menjaga stabilitas membran (Brock, 2009).

### **2.4 Enzim Protease**

Menurut Lehniger (1982), enzim merupakan unit fungsional dalam metabolisme sel. Enzim merupakan metabolisme khusus yang dapat bergabung dengan suatu substrat khusus yang dapat mengkatalisasi reaksi biokimia dari substrat tersebut. Spesifitas

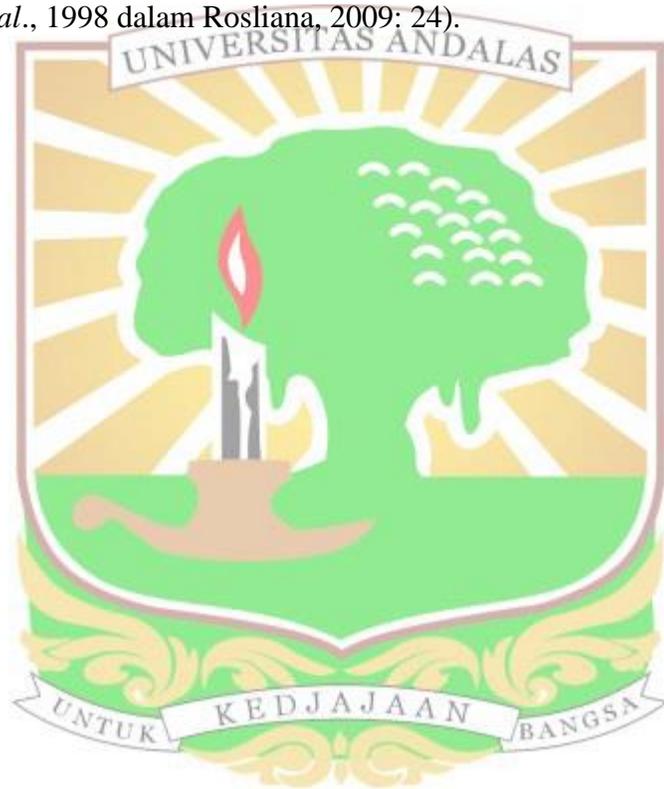
enzim sangat penting terhadap substratnya, enzim mempercepat reaksi biokimiawi spesifik tanpa pembentukan produk samping. Dalam reaksi tersebut, enzim merubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk senyawa baru yang disebut produk. Enzim memiliki substrat spesifik dan reaksi kimia yang spesifik untuk dikatalisnya. Enzim memiliki tenaga katalitik yang biasanya jauh lebih besar dari pada katalisator sintetik.

Protease merupakan kelompok enzim yang sangat kompleks yang menduduki posisi sentral dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersil. Protease ekstraseluler berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik intraseluler memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada hewan tumbuhan dan mikroorganisme seperti mengganti protein, memelihara keseimbangan antara degradasi dan sintesis protein. Protease intraseluler berperan dalam fungsi fisiologis lainnya seperti pencernaan, maturasi hormon, perakitan virus, respon imun, inflamantasi, fertilisasi koagulasi darah, fibrinolysis, kontrol tekanan darah, sporulasi, germanisasi dan pathogenesis. Protease juga diimplikasikan dalam peran regulasi ekspresi gen, perbaikan DNA dan sintesis DNA (Rao *et al.*, 1998 dalam Rosliana, 2009).

Protease adalah enzim yang mempunyai daya katalitik terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein yang menghasilkan asam amino dan peptida dengan bantuan molekul air (Rao, Tanksale *et al*, 1998). Berdasarkan dari lingkungan daya kerjanya, protease dapat dikelompokkan menjadi protease alkali, netral, dan asam (Suhartono, 1991).

## 2.5 Klasifikasi Protease

Berdasarkan sistem klasifikasi *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, enzim-enzim proteolitik mikroba dapat dibedakan atas endopeptidase dan eksopeptidase. Protease diklasifikasikan berdasarkan tiga kriteria utama, yaitu tipe reaksi yang dikatalisisnya, struktur kimia alami yang ada pada sisi katalitiknya, dan strukturnya yang berhubungan dengan evolusi (Rao *et al.*, 1998 dalam Rosliana, 2009: 24).



## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, UPT Sumber Daya Hayati, Universitas Andalas, Padang. Penelitian ini dilakukan bulan Januari-Juli 2022.

### 3.2. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan penentuan profil pertumbuhan, pengaruh suhu dan pH terhadap pertumbuhan serta menentukan aktivitas protease dari bakteri termofilik sumber air panas Curup, Bengkulu.

### 3.3. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu cawan petri, tabung reaksi, labu erlenmeyer, termometer, pH meter, kapas, kain kasa, tisu, gelas ukur, pipet tetes, *platform shaker*, *magnetic stirrer*, botol sampel, jarum ose, *hotplate stirrer*, autoklaf, lampu spiritus, spektrofotometri, timbangan analitik, gelas beker, inkubator, dan *aluminium foil*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu isolat potensial bakteri air panas yang berasal dari sumber air panas Curup, Bengkulu, akuades, Medium Nutrien Agar, NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Kasein, Tris-HCl, TCA,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan Folin Ciocalteu.

### 3.4. Cara Kerja

#### 3.4.1. Tahap Persiapan

##### 3.4.1.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Untuk Sterilisasi seluruh peralatan dan medium yang akan digunakan disterilisasikan menggunakan autoklaf dengan suhu  $121\text{ }^\circ\text{C}$ , dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.1.2. Pembuatan Medium Skim Milk Agar (SMA)**

Untuk pembuatan medium SMA digunakan Susu Skim 20 g dan Bacto Agar 15 g, selanjutnya dimasukkan 1000 ml akuades ke dalam *gelas beker*. Setelah itu dipanaskan diatas *hotplate stirrer* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Terakhir disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### **3.4.1.3. Pembuatan Medium Nutrien Agar (NA)**

Untuk pembuatan medium NA dapat ditimbang NA sebanyak 20 g, kemudian dimasukkan kedalam gelas beker, setelah itu ditambah akuades steril sampai volume 1000 ml. Kemudian dipanaskan sampai mendidih, dan selanjutnya medium dituangkan ke dalam erlenmeyer steril kemudian ditutup rapat menggunakan kapas dan dibungkus dengan *aluminium foil*. Terakhir medium di sterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### **3.4.1.4 Pembuatan Medium Produksi Protease**

Untuk pembuatan medium Produksi protease dapat disiapkan medium untuk produksi enzim protease dengan komposisi perliternya:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g;  $\text{MgSO}_4$  5 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g, NaCl 5 g dan kasein 10 g.

### **3.4.2. Tahap Pelaksanaan**

#### **3.4.2.1. Peremajaan Bakteri Termofilik**

Peremajaan dua puluh tujuh isolat bakteri dilakukan dengan mengambil masing-masing 1 ose biakan murni, kemudian digoreskan pada media NA, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50 °C, kemudian diinokulasikan pada media miring dan disimpan pada inkubator suhu 50 °C.

#### **3.4.2.2 Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Protease**

Skrining bakteri proteolitik dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri termofilik pada media SMA. Sebanyak 1 ose biakan miring masing-masing isolat bakteri diinokulasi pada media SMA, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu

50 °C. Bakteri berindikasi penghasil protease jika terbentuk zona bening disekitar koloni bakteri. Koloni bakteri dan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri diukur diameternya dan selanjutnya ditentukan Indeks Proteolitik (IP):

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

Dicatat isolat yang mempunyai IP yang paling tinggi (Agustien, 2010).

#### **3.4.2.3. Profil Pertumbuhan Bakteri Termofilik Penghasil Protease**

Profil pertumbuhan bakteri termofilik dilakukan pada isolat dengan indeks proteolitik (IP)  $\geq 2$ . Untuk mengetahui profil pertumbuhan bakteri termofilik ini dapat dilakukan dengan cara disediakan medium produksi protease sebanyak 100 ml pada Erlenmeyer 250 ml yang telah steril. Kemudian diinokulasikan 1-2 ose biakan miring masing-masing isolat pada media produksi protease. Diinkubasi pada suhu 50 °C (inokulum), agitasi 150 rpm selama 24 jam. Setelah itu dipipetkan 5 ml inokulum ke dalam 95 ml media produksi protease pada Erlenmeyer 250 ml. Disampling 1 ml dari kultur bakteri, kemudian diukur kekeruhan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600  $\mu\text{m}$  ( $t_0$ ). Setiap interval 1 jam dilakukan pencuplikan pada kultur bakteri seperti langkah sebelumnya. Cuplikan dihentikan setelah terjadi penurunan pertumbuhan isolat bakteri, diperoleh profil pertumbuhan masing-masing bakteri.

#### **3.4.2.4 Pengaruh Suhu Terhadap Pertumbuhan Bakteri Thermo-Protease**

Untuk mengetahui pengaruh suhu pada bakteri termofilik dapat dengan cara disiapkan sejumlah Erlenmeyer yang berisikan 95 ml media produksi protease yang telah disterilisasi. Dibuat inokulum masing-masing isolat potensial berdasarkan hasil yang telah didapatkan dari langkah 3.4.2.3. Dipipetkan 5 ml masing-masing inokulum pada media produksi protease sebanyak 95 ml, kemudian diinkubasi pada masing-masing suhu 50 °C, 60 °C, 70 °C, dan 80 °C, agitasi 150 rpm selama waktu tertentu (idiofase) dari masing-masing isolat bakteri. Kultur bakteri diukur kekeruhannya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600  $\mu\text{m}$ , sehingga diperoleh suhu optimum pertumbuhan masing-masing bakteri.

#### 3.4.2.5 Pengaruh pH Terhadap Pertumbuhan Bakteri Thermo-Protease

Untuk mengetahui pengaruh pH bakteri termofilik dapat dilakukan dengan disiapkan sejumlah Erlenmeyer yang berisikan 95 ml medium produksi protease yang bervariasi dengan masing-masing pH 5, 6, 7, 8, dan 9 yang telah disterilisasi. Dibuat inokulum masing-masing isolat potensial berdasarkan hasil yang telah didapatkan dari langkah 3.4.2.4.. Kemudian diinkubasi pada suhu optimum, agitasi 150 rpm. Kultur bakteri diukur kekeruhannya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600  $\mu\text{m}$ , sehingga diperoleh pH optimum pertumbuhan masing-masing bakteri.

#### 3.4.2.6 Pengujian Aktivitas Enzim Protease

Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan metode Walter (Mubarik, 2001). Sebanyak 0,25 ml kasein dalam 0,25 ml 0,05 M bufer Tris-HCl pH 8,0 dimasukkan pada tabung reaksi dan dipreinkubasi pada suhu 60° C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 0,05 ml larutan enzim dan diinkubasi pada suhu 60° C selama 15 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 1,2 ml 10% TCA. Prosedur yang sama dilakukan untuk larutan standar 5 mmol/L tirosin dan blanko. Pada blanko, enzim ditambahkan setelah direaksikan dengan TCA. Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000rpm selama 15 menit. Sebanyak 0,375 ml supernatan dipindahkan kedalam tabung yang bersih, kemudian ditambahkan 1,25 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dan 0,25 ml 1N reagen Folin Ciocalteu. Absorbansi dibaca pada  $\lambda=578$  nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan  $\mu\text{mol}$  produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran.

Aktivitas enzim dapat ditentukan dengan formula :

$$\text{Aktivitas (Unit/ml)} = \frac{(\text{Asampel} - \text{Ablanko})}{(\text{Astandar} - \text{Ablanko})} \times \frac{1}{\text{waktu reaksi}}$$

#### 3.4.3. Analisis Data

Analisis data untuk penelitian dilakukan dengan parameter pengamatan. Adapun parameter yang dianalisis yaitu profil pertumbuhan, efek suhu, pH dan aktivitas protease dari isolat termofilik sumber air panas Curup, Bengkulu.

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian yang telah dilakukan mengenai profil pertumbuhan bakteri termo-proteolitik, pengaruh suhu, pH dan aktivitas enzimnya didapatkan hasil sebagai berikut:

### 4.1 Skrinning Bakteri Termo-Proteolitik

Sebanyak 27 isolat bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Curup Bengkulu telah diuji aktivitas enzim protease secara kualitatif dengan menggunakan media SMA. Indeks Proteolitik (IP) ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Beberapa isolat yang memiliki nilai IP terbaik dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Rata-rata Indeks Proteolitik (IP) dari Isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Curup, Bengkulu

No.	Kode Isolat	Diameter (mm)		Indeks Proteolitik (IP)
		Koloni	Zona Bening	
1.	APK1-S1-01	6,98	13,5	0,93
2.	APK1-S1-02	2,93	13,06	3,45
3.	APK1-S1-03	3,11	15,64	4,02
4.	APK1-S1-04	3,18	20,18	5,34
5.	APK1-S2-01	35,79	-	-
6.	APK2-S2-02	31,4	-	-
7.	APK2-S2-03	57,88	-	-
8.	APK3-S3-01	26,81	-	-
9.	APK3-S3-02	61,77	-	-
10.	APK3-S3-03	48,13	-	-
11.	APK4-S4-01.1	54,6	-	-
12.	APK4-S4-01.2	45,8	-	-
13.	APK4-S4-02	4,1	-	-
14.	APK4-S4-03	6,68	8,58	0,28
15.	SAK1-S1-01	65,29	-	-
16.	SAK1-S1-02.1	31,02	31,63	0,01
17.	SAK1-S1-02.2	25,79	-	-
18.	SAK1-S1-03.1	50,92	-	-
19.	SAK1-S1-03.2	4,19	-	-
20.	SAK1-S1-04	6,06	11,81	0,94
21.	SBKJ-01	5,91	8,71	0,47
22.	SBKJ-02	26,42	-	-
23.	SBKH-01	95,76	-	-
24.	SBAMK1-S1-01	20,49	-	-
25.	SBAMK1-S1-02	63,91	67,09	0,04
26.	SBAMK1-S1-03	55,61	-	-
27.	SBAMK1-S1-04	4,34	6,85	0,57

Keterangan: AP : Air Putih, SB : Suban, SA : Samaleko Atas, SB : Samaleko Bawah

Tabel 1 menunjukkan 10 isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Curup, Begkulu yang menghasilkan zona bening disekitar koloni bakteri. Sedangkan 17 isolat lainnya tidak terbentuk zona bening di sekitar koloninya. Terbentuknya zona bening disebabkan karena isolat bakteri yang digunakan bersifat proteolitik.

Menurut Poernomo dan Purwanto (2003) menyatakan bahwa zona bening terjadi apabila protein yang terdapat dalam media susu skim dihidrolisis oleh enzim ekstraseluler menjadi asam amino yang dapat digunakan secara langsung oleh sel sebagai sumber nutrisi. Hal ini dilakukan karena sel tidak mampu memanfaatkan protein yang bersifat makromolekul secara langsung untuk ditransfer ke dalam sel. Menurut Hidayat *et al.* (2006), hidrolisis kasein dalam susu skim sering digunakan untuk determinasi proteolisis oleh mikroorganisme pada medium agar. Koloni bakteri akan membentuk zona bening sebagai hasil perubahan kasein menjadi senyawa nitrogen yang larut.

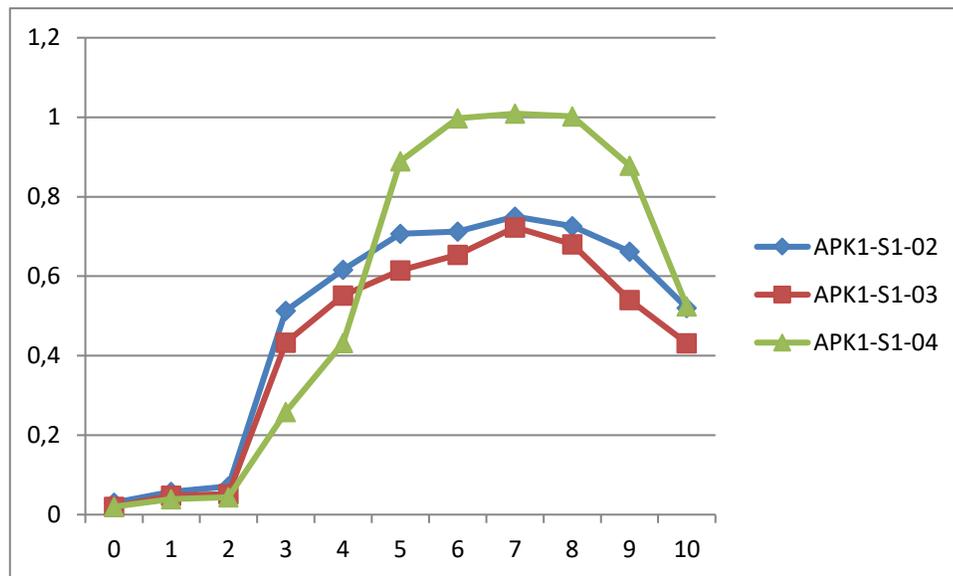
Media yang digunakan untuk uji secara kualitatif pada penelitian ini yaitu susu skim yang disuspensikan dalam medium. Susu skim mengandung kasein yang berfungsi sebagai substrat enzim. Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsium kalseinat. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease. Protease mengkatalisis degradasi kasein yaitu dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air ke dalam molekul. Reaksi tersebut akan melepaskan asam amino (Pakpahan, 2009). Terdapat 17 isolat bakteri yang tidak membentuk zona bening disekitar koloni. Hal ini menandakan bahwa isolat bakteri tersebut tidak dapat menghasilkan enzim protease.

Menurut Sastramihardja (1998) dalam Kurniawan (2011), apabila terdapat koloni disekitar zona bening sebesar  $\geq 2$ , maka dapat dikatakan bakteri tersebut termasuk galur yang baik untuk menghasilkan enzim protease. Terbentuknya zona bening disebabkan oleh bakteri yang mampu mensekresikan protease netral ke lingkungannya sehingga protein susu akan terhidrolisis dan menyebabkan terbentuknya zona bening. Tabel 1 menunjukkan 3 isolat bakteri yang menghasilkan Indeks Proteolitik (IP) tertinggi yaitu pada isolat bakteri APK1-S1-02 dengan nilai OD 3,45, isolat bakteri APK1-S1-03 dengan nilai OD 4,02 dan isolat bakteri APK1-

S1-04 dengan nilai OD 5,34. Ketiga isolat ini akan digunakan dalam pengujian-pengujian selanjutnya.

#### 4.2 Profil Pertumbuhan Bakteri Thermo-Proteolitik

Profil pertumbuhan tiga isolat bakteri thermo-proteolitik ditampilkan pada gambar berikut.



Gambar 1. Profil kurva pertumbuhan isolat bakteri thermo-proteolitik

Gambar 1 menunjukkan hasil pengamatan profil kurva pertumbuhan dari ketiga isolat bakteri termofilik selama 10 jam. Pada kurva dapat dilihat dengan jelas fase adaptasi dari masing-masing isolat. Yuliana (2008) menyatakan bahwa bakteri yang ditumbuhkan pada media yang sama saat pembuatan inokulum dapat menyebabkan singkatnya fase adaptasi. Hal itu disebabkan karena mikroba dapat dengan cepat menyesuaikan diri pada lingkungan yang baru. Pada fase adaptasi, pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh banyaknya jumlah sel saat diinokulasi, keadaan morfologis serta fisiologis bakteri dan juga media kultivasi yang digunakan (Fardiaz, 1992).

Pada isolat bakteri APK1-S1-02 fase eksponensialnya terjadi pada jam ke-7, isolat bakteri APK1-S1-03 fase eksponensialnya terjadi pada jam ke-7 dan isolat bakteri APK1-S1-04 fase eksponensialnya terjadi pada jam ke-7. Sekilas pada kurva tumbuh isolat APK1-S1-04 pada jam 6-7 tidak terlihat kenaikan yang signifikan, namun nilai OD yang menunjukkan fase eksponensialnya berada pada jam ke-7.

Keterangan yang lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran. Saat berada pada fase eksponensial, sel yang ada pada mikroba membelah diri secara bergandaan juga dalam keadaan sel yang stabil. Pada fase ini mikroba memproduksi banyak zat-zat metabolit sekunder untuk memenuhi kebutuhan nutrisi mikroba tersebut (Hamdiyanti, 2011).

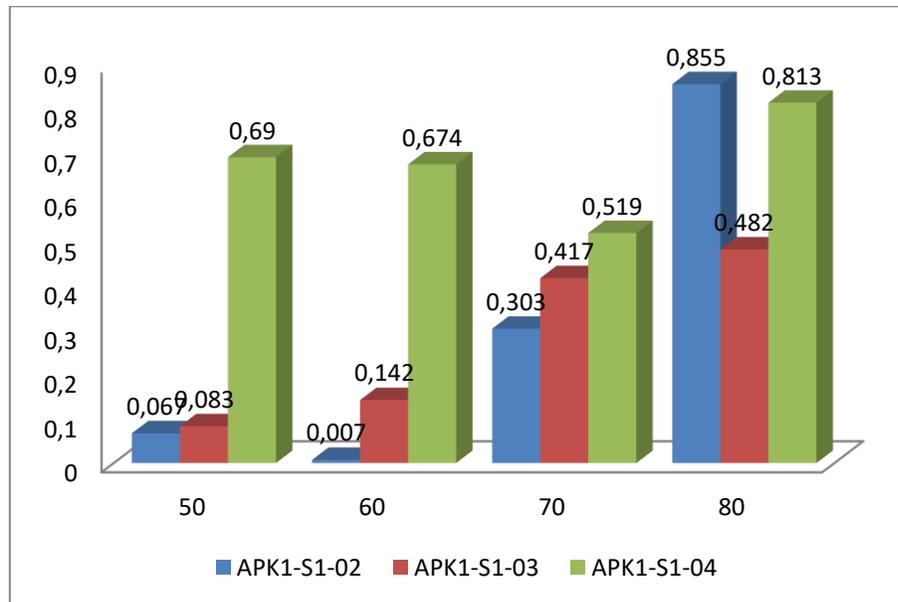
Fase stasioner isolat bakteri APK1-S1-02 dan isolat APK1-S1-03 terlihat pada jam ke-7 sampai jam ke-8. Lama dari fase stasioer kedua isolat tersebut terbilang singkat/pendek. Hal tersebut bisa jadi disebabkan karena pada fase stasioner ini metabolisme dari kedua isolat tersebut sangat tinggi. Sedangkan fase stasioner dari isolat bakteri APK1-S1-04 tidak dapat dideteksi. Pada fase ini pada umumnya mikroba dapat menghasilkan metabolit sekunder (Crueger dan Crueger,1984).

Fase kematian pada isolat APK1-S1-02 terjadi pada jam ke-8, fase kematian isolat APK1-S1-03 terjadi pada jam ke-8 dan fase kematian isolat APK1-S1-04 juga terjadi pada jam ke-8. Fase kematian merupakan penurunan garis lurus yang dapat dilihat dan digambarkan oleh jumlah sel hidup terhadap waktu. Pada fase ini jumlah bakteri hidup berkurang dan grafik menurun. Fase kematian terjadi karena berkurangnya nutrisi dan makanan yang dibutuhkan oleh mikroba untuk bertahan hidup sehingga mikroba melakukan ekskresi yang dapat menyebabkan tertimbunnya hasil ekskresi. Hal ini dapat mengganggu pertumbuhan dari mikroba yang akan berkembang selanjutnya (Fardiaz, 1992).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Arzita dan Agustien (2013) bakteri *Basillus* sp. PA-05 pertumbuhan optimalnya pada jam ke-14. Pada penelitian Agustien *et al.*, (2010) pada *Brevibacillus agri* A-03 termofilik, didapatkan profil pertumbuhan pada jam ke-2 sampai jam ke-18 mengalami fase eksponensial dan selanjutnya mengalami fase stasioner hingga jam ke 22. Populasi bakteri ini mengalami peningkatan pada jam ke-32 masa inkubasi dan populasinya mulai menurun pada jam ke-38.

### 4.3 Pengaruh Suhu Terhadap Pertumbuhan Bakteri Termo-Proteolitik

Pengaruh suhu pada tiga isolat bakteri termo-proteolitik dari pengujian ini ditampilkan pada grafik berikut,



Gambar 2. Histogram Pengaruh Suhu terhadap isolat bakteri termo-proteolitik

Pada pengujian pengaruh variasi suhu terhadap pertumbuhan bakteri isolat sumber air panas Curup, Bengkulu didapatkan hasil dari ketiga isolat. Isolat bakteri dicuplik pada fase eksponensialnya yaitu di jam ke-7. Gambar 2 menunjukkan pertumbuhan isolat bakteri APK1-S1-02 tumbuh optimum pada suhu 80 °C dengan nilai absorbansi 0,855, pertumbuhan isolat bakteri APK1-S1-03 tumbuh optimum pada suhu 80 °C dengan nilai absorbansi 0,482, pertumbuhan isolat bakteri APK1-S1-04 tumbuh optimum pada suhu 80 °C dengan nilai absorbansi 0,69.

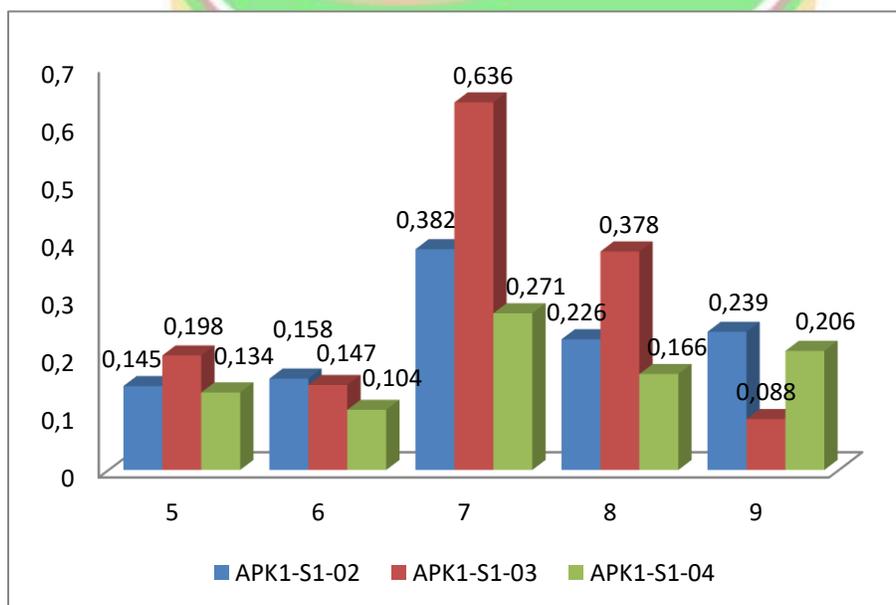
Sadikin (2002) dalam Iswendi (2009) menyatakan, jika suhu di bawah suhu optimum, maka aktivitas enzim akan rendah. Begitu juga dengan pH, jika dilakukan pengujian di bawah pH optimum maka aktivitas enzim akan rendah. Ini dapat terjadi karena struktur tiga dimensi enzim sudah berubah, sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim. Akibatnya proses katalis tidak berlangsung dengan sempurna. Elias *et.,al* (2014) juga menyatakan bahwa laju pertumbuhan pada mikroba dipengaruhi oleh suhu. Perubahan suhu dapat berpengaruh pada aktivitas reaksi kimia

dan struktur molekul proteinnya. Apabila terjadi peningkatan suhu maka reaksi kimia akan mengalami kenaikan dan energi kinetik reaktan juga akan meningkat.

Menurut penelitian sebelumnya tentang enzim protease yang diisolasi dari sumber air panas Tangkuban Perahu memiliki aktivitas tertinggi pada pH 8 dan suhu 60°C (Amelinda,2010). Penelitian Hafiz (2011), juga berhasil mengisolasi bakteri penghasil enzim protease dari sumber air panas semurup Kabupaten Kerinci, Jambi dengan aktivitas tertinggi pada pH 8 dan suhu 55°C. Penelitian Naiola dan Widyastuti (2007) melaporkan bahwa bakteri penghasil protease, *Bacillus sp.* Mampu menghasilkan protease pada rentang aktivitas suhu 37-65°C, laju katalitik optimum pada suhu 55°C dan aktivitasnya menurun pada suhu diatas 55°C. Hal ini disebabkan enzim mengalami denaturasi sehingga terjadi perubahan struktur dan konfirmasi pada suhu tinggi sehingga substrat terhambat memasuki sisi aktif enzim (Kosim dan Putra, 2010). Berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan, pertumbuhan bakteri yang didapatkan mampu bertahan dan optimum di suhu 80°C.

#### 4.4 Pengaruh pH Terhadap Pertumbuhan Bakteri Termo-Proteolitik

Hasil pengujian pengaruh pH pada tiga isolat bakteri termo-proteolitik ini dapat dilihat pada grafik berikut,



Gambar 3. Histogram Pengaruh pH terhadap isolat bakteri termo-proteolitik

Pada gambar 3 didapatkan isolat bakteri APK1-S1-02 tumbuh optimum pada pH 7 dengan nilai absorbansi 0,382, isolat bakteri APK1-S1-03 tumbuh optimum pada pH 7 dengan nilai absorbansi 0,636, isolat bakteri APK1-S1-04 tumbuh optimum pada pH 7 dengan nilai absorbansi 0,271. Menurut Supriantini (2008), pertumbuhan mikroba sangat dipengaruhi oleh pH lingkungan disekitarnya. Apabila kondisi lingkungannya berubah, mikroba bisa jadi tidak dapat beradaptasi dan menyebabkan kematian. Hal ini sangat dipengaruhi oleh metabolisme yang terjadi pada mikroba tersebut.

Lehninger (1982) menyatakan bahwa setiap enzim memiliki pH optimumnya masing-masing. Pada pH tertentu struktur tiga dimensinya dapat paling kondusif untuk mengikat substrat. Jika konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, maka aktivitas enzim secara progresif hilang, sehingga dapat menyebabkan enzim menjadi tidak aktif. Menurut Palmer (1981), aktivitas enzim menurun pada pH 8 sebab terjadinya perubahan ion substrat dan enzim. Perubahan tersebut dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi sebagai pertahanan struktur tersier dan kuaterner enzim yang aktif. Perubahan struktur tersier dapat mengakibatkan sisi hidrofobik yang awalnya tersimpan pada bagian dalam molekul enzim menjadi terbuka, sehingga kelarutan enzim berkurang. Berkurangnya kelarutan enzim dapat menurunkan aktivitas katalitik enzim secara perlahan.

Hasil penelitian Sugiyono (2003) pada sumber air laut panas Poso menunjukkan protease dari *Bacillus* sp. memiliki aktivitas optimum pada kondisi pH 7 dan suhu 60 °C. Hasil penelitian tersebut sama dengan penelitian ini yaitu memiliki pH optimum 7. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Naiola dan Widhyastuti (2007), aktivitas protease tertinggi yang didapatkan yaitu pada pH 8 dan suhu 55 °C untuk *Bacillus* sp. yakni sebesar 1,8 x 10<sup>2</sup> U/mg dan laju reaksi enzimatik mengalami penurunan pada pH diatas 8 bahkan bisa mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya.

#### 4.5 Pengujian Aktivitas Protease

Pengujian aktivitas protease dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Aktivitas Protease dari ketiga isolat bakteri termofilik

No.	Isolat	Aktivitas enzim (U/ml)
1.	AP-K1-S1-02	0,128
2.	APK1-S1-03	0,123
3.	APK1-S1-04	0,13

Pada tabel 2 ditampilkan nilai aktivitas protease dari masing-masing isolat bakteri. Aktivitas protease isolat bakteri APK1-S1-02 yaitu sebesar 0,128 U/ml, aktivitas protease isolat bakteri APK1-S1-03 yaitu sebesar 0,123 U/ml, aktifitas protease isolat bakteri AP/K1/S1/04 yaitu sebesar 0,13 U/ml. Rahmasari (2011), melaporkan dari ketiga isolat bakteri termofilik penghasil protease yang berasal dari sumber air panas Pekonina, Solok Selatan, Sumatera Barat dengan aktivitas protease tertinggi pada isolat bakteri TBPH-17 sebesar 0,330 U/ml, isolat bakteri TBPH-19 dengan nilai aktivitas protease sebesar 0,296 U/ml, dan aktivitas protease terendah pada isolat bakteri TBPH-10 sebesar 0,276 U/ml. Pada pengujian aktivitas protease dari isolat bakteri air panas Sipoholon, Tapanuli Sumatera Utara didapatkan isolat SP2 memiliki aktivitas protease tertinggi sebesar 14,94 U/ml dan isolat bakteri SP3 nilai aktivitas protease sebesar 11,6 U/ml dan isolat bakteri SP1 merupakan isolat dengan nilai aktivitas protease terendah yaitu 9,50 U/ml (Pakpahan, 2009).

Menurut Agustien (2010), jenis mikroba dapat menyebabkan perbedaan aktivitas enzim yang dihasilkan dari masing-masing isolat. Aktivitas enzimatis setiap mikroba juga dipengaruhi oleh perbedaan urutan dan jumlah asam amino yang terbentuk. Dari aktivitas enzim isolat *Bacillus* sp. juga dapat dipengaruhi oleh jumlah enzim dan asam amino yang dihasilkan oleh isolat yang berbeda.

## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Profil pertumbuhan dari ketiga isolat bakteri termofilik penghasil protease yang potensial dari sumber air panas Curup, Bengkulu tampak berbeda satu sama lainnya. Namun dari hasil nilai OD yang didapatkan dari ketiga isolat ternyata sama-sama optimum di jam ke-7.
2. Suhu tertinggi isolat bakteri APK1-S1-02 dan APK1-S1-03 dalam menghasilkan protease adalah di suhu 80 °C dan isolat bakteri APK1-S1-04 juga di suhu 80 °C dengan pH optimum dari ketiga isolat bakteri ini yaitu di pH 7.
3. Aktivitas protease tertinggi didapatkan pada isolat bakteri APK1-S1-04 yaitu sebesar 6,9 U/ml, lalu aktivitas protease isolat bakteri APK1-S1-02 yaitu sebesar 5,2 U/ml, aktivitas protease terendah pada isolat bakteri APK1-S1-03 yaitu sebesar 3,2 U/ml.

### 5.2 Saran

Penelitian ini perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai identifikasi bakteri agar didapatkan jenis bakteri dan pengujian lainnya seperti uji variasi konsentrasi substrat, uji variasi konsentrasi enzim, dan pengaruh aktivitas enzim untuk pemanfaatan enzimnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung.
- Amelinda, I., 2010, *Isolasi Dan Optimasi Protease Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung*, Skripsi, Departemen Biokimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Arzita and A. Agustien. 2013. Potensi *Bacillus* sp. PA-05 termofilik. Prosiding Semirata BKS-PTN B, Universitas Lampung. Lampung
- Crueger, W., Dan Crueger, A., 1984, *Biotechnology A textbook of Industrial Microbiology* Brock, T. D. (trans), 54 – 55, Science Tech, Inc, Madison.
- Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre, M.P.C., Schwan, R.F. 2008. *Alkaline protease from Bacillus sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey*. World J. Microbiol. Biotechnol. 24:2027–2034.
- Edwards, C. 1990. *Thermophiles in: Microbiology of Extreme Environments*. Graw-Hill Publ. Company. New York.
- Elias AN, Nanda VS, Barr RJ. 2003. Effect of PTU on IL-12 and IL-10 in psoriasis. *J Drugs Dermatol*;2:6:645-648
- Fardiaz, S. 1989. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hafiz, M. K., 2011, *Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Kabupaten Kerinci*, Tesis, PascaSarjana Universitas Andalas, Sumatera Barat.
- Hidayat, N., M. Pradaga dan S. Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi. Yogyakarta
- Kosim, M., S.R.Putra. 2010. *Pengaruh Suhu pada Protease dari Bacillus subtilis. Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010*. Jurusan Kimia FMIPA ITS Surabaya
- Kumar, S. And R. Nussinov. 2001. *How do Thermophilic Protein deals with heat? A review*. *Cell molecular life science*, 58: 1216-1233.
- Kurniawan, H.M. 2011. *Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Kabupaten Kerinci*, Jambi. Tidak dipublikasikan. Pasca Sarjana Universitas Andalas. Padang.
- Lehninger, AL. 1982. *Dasar-dasar Biokimia* (terj.). Jakarta: Erlangga.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., dan Parker, J., 2000, *Brock Biology of Microorganism*, Prentice Hall Inc, New Jersey.

- Martin, M.L.L., Delatorre, A.B.S., and Camila, R. 2007. *Effect of Culture Conditions on the production of Extracellular Protease by Thermophilic Bacillus sp. And Some Properties of the Enzymatic Activity*. *Brazilia. Microbiol.* 38 : 253 – 258
- Naiola E dan Widhyastuti N. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi*, 16 (3): 467-473.
- Ninghoujam D. S., Kshetri P. 2010. *A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant Bacillus subtilis strain SH1*. *Australian J.Basic Appl Sci.* 4: 5126–5134.
- Pakpahan R. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatra Utara*. Tesis. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Palmer, T. 1981. *Understanding Enzymes*. England: Elli Horwood.
- Poernomo, A. T., dan Purwanto, D.A., 2003, Uji aktifitas crude enzim proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 hasil fermentasi curah, *Majalah Farmasi Airlangga*, 3: 103–107.
- Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Gahtge, and V.V, Deshpande. 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease*. *Microbiology Biology Review*, 62: 597-635.
- Sugiyono, A. J., Lintang, R. A., Sabe, 2003, *Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah*, Skripsi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Sugiyono., R. A. J. Lintang dan R. A. Sabe. 2008. Karakterisasi Protease Bakteri Termofil Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. *Penelitian Perikanan*, 11(2): 156-162.
- Suhartono, M.T. 1991. *Protease*, PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Suhartono, M. T. 2000. *Exploration Of Indonesian thermophiles Producing Thermostable Chitinolytic Enzymes*. Research Center for Biotechnology. Bogor Agric. University. Bogor.



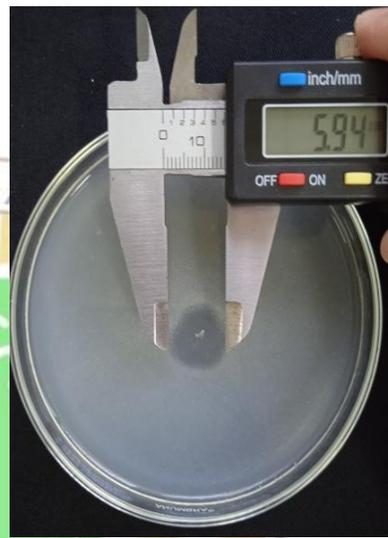
## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Gambar Hasil Skringing Bakteri Termofilik

#### 1.1 Isolat Bakteri dengan nilai IP tinggi



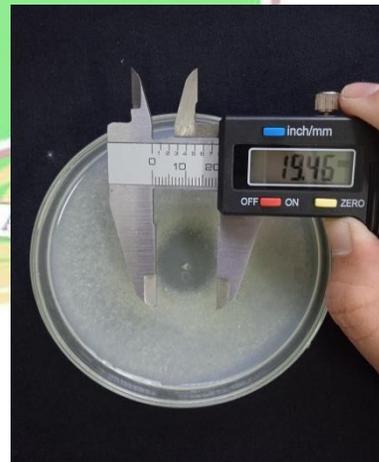
APK1-S1-02



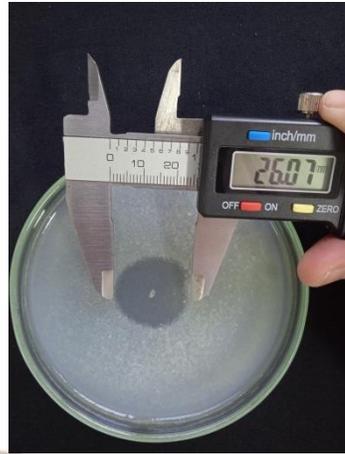
APK1-S1-02'



APK1-S1-03

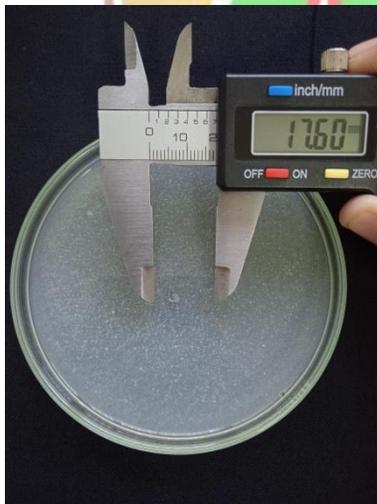


APK1-S1-03'



APK1-S1-04 UNIVERSITAS ANDALA APK1-S1-04'

### 1.2 Isolat Bakteri dengan nilai IP rendah



APK3-S3-03



APK3-S3-03'

## Lampiran 2. Perhitungan Indeks Proteolitik (IP)

Rumus:  $IP = \frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}}$

diameter koloni

<p>1) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) APK1-S1-01  <math>ZB_1=12,3</math>    <math>DK_1 = 3,83</math>  <math>ZB_2=14,77</math>    <math>DK_2 = 10,14</math>  <math>\Sigma ZB=13,5</math>    <math>\Sigma DK= 6,98</math></p> $\Sigma IP = \frac{13,5 - 6,98}{6,98}$ $= 0,93$	<p>2) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) APK1-S1-02  <math>ZB_1=12,31</math>    <math>DK_1 = 3,21</math>  <math>ZB_2=13,81</math>    <math>DK_2 = 2,65</math>  <math>\Sigma ZB=13,06</math>    <math>\Sigma DK= 2,93</math></p> $\Sigma IP = \frac{13,06 - 2,93}{2,93}$ $= 3,45$
<p>3) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) APK1-S1-03  <math>ZB_1=13,14</math>    <math>DK_1 = 4,2</math>  <math>ZB_2=19,46</math>    <math>DK_2 = 2,02</math>  <math>\Sigma ZB=15,64</math>    <math>\Sigma DK= 3,11</math></p> $\Sigma IP = \frac{15,64 - 3,11}{3,11}$ $= 4,02$	<p>4) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) AP-K1-S1-04  <math>ZB_1=14,29</math>    <math>DK_1 = 3,14</math>  <math>ZB_2=26,07</math>    <math>DK_2 = 3,23</math>  <math>\Sigma ZB=20,18</math>    <math>\Sigma DK= 3,18</math></p> $\Sigma IP = \frac{20,18 - 3,28}{3,18}$ $= 5,34$
<p>5) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) APK4-S4-03  <math>ZB_1=4,84</math>    <math>DK_1 = 5,88</math>  <math>ZB_2=8,52</math>    <math>DK_2 = 11,29</math>  <math>\Sigma ZB=8,58</math>    <math>\Sigma DK= 6,68</math></p> $\Sigma IP = \frac{8,58 - 6,68}{6,68}$ $= 0,28$	<p>6) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) SAK1-S1-02.1  <math>ZB_1=15,86</math>    <math>DK_1 = 13,72</math>  <math>ZB_2=51,43</math>    <math>DK_2 = 48,32</math>  <math>\Sigma ZB=31,63</math>    <math>\Sigma DK= 31,02</math></p> $\Sigma IP = \frac{31,63 - 31,02}{31,02}$ $= 0,01$
<p>7) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) SAK1-S1-04  <math>ZB_1=11,33</math>    <math>DK_1 = 5,53</math>  <math>ZB_2=12,29</math>    <math>DK_2 = 6,6</math>  <math>\Sigma ZB=11,81</math>    <math>\Sigma DK= 6,06</math></p> $\Sigma IP = \frac{11,81 - 6,06}{6,06}$ $= 0,94$	<p>8) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) SAKJ-01  <math>ZB_1=8,8</math>    <math>DK_1 = 6,27</math>  <math>ZB_2=8,62</math>    <math>DK_2 = 5,56</math>  <math>\Sigma ZB=8,71</math>    <math>\Sigma DK= 5,91</math></p> $\Sigma IP = \frac{8,71 - 5,91}{5,91}$ $= 0,47$
<p>9) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) SBMK1-02  <math>ZB_1=68,68</math>    <math>DK_1 = 66,23</math>  <math>ZB_2=65,50</math>    <math>DK_2 = 61,6</math>  <math>\Sigma ZB=67,09</math>    <math>\Sigma DK= 63,91</math></p> $\Sigma IP = \frac{67,09 - 63,91}{63,91}$ $= 0,04$	<p>10) Perhitungan Indeks Proteolitik (IP) SBMK1-04  <math>ZB_1=4,13</math>    <math>DK_1 = 2,92</math>  <math>ZB_2=9,57</math>    <math>DK_2 = 5,77</math>  <math>\Sigma ZB=6,85</math>    <math>\Sigma DK= 4,34</math></p> $\Sigma IP = \frac{6,85 - 4,34}{4,34}$ $= 0,57$

### Lampiran 3. Profil pertumbuhan bakteri termo-proteolitik

Nilai OD 3 isolat bakteri termofilik hasil skrining:

Isolat	Jam pengamatan								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
AP/K1/S1/02	0,03	0,057	0,041	0,513	0,616	0,712	0,707	0,750	0,726
AP/K1/S1/03	0,02	0,048	0,039	0,433	0,551	0,615	0,654	0,723	0,680
AP/K1/S1/04	0,04	0,039	0,037	0,258	0,432	0,889	0,997	1,009	1,002

### Lampiran 4. Pengujian beberapa suhu pada isolat bakteri termo-proteolitik

Nilai OD 3 isolat bakteri termofilik setelah diujikan beberapa suhu

Isolat	Suhu			
	50	60	70	80
AP/K1/S1/02	0,067	0,7	0,303	0,855
AP/K1/S1/03	0,083	0,142	0,417	0,482
AP/K1/S1/04	0,69	0,674	0,519	-

### Lampiran 5. Pengujian beberapa pH pada isolat bakteri termo-proteolitik

Nilai OD 3 isolat bakteri termofilik setelah diujikan beberapa pH

Isolat	pH				
	5	6	7	8	9
APK1-S1-02	0,487	0,067	0,007	0,303	0,855
APK1-S1-03	0,338	0,083	0,142	0,417	0,482
APK1-S104	0,526	0,69	0,674	0,519	0,813

## Lampiran 6. Nilai OD Enzim Protease



## Lampiran 7. Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

### 7.1 Data Nilai Absorbansi Sampel

Isolat	Absorbansi Sampel			Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan3	
APK1-S1-02	0,496	0,285	0,329	0,37
APK1-S1-03	0,32	0,321	0,043	0,228
APK1-S1-04	0,28	0,596	0,597	0,491

### 7.2 Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

$$UA = \frac{Asp-Abl}{Ast-Abl} \times \frac{1}{T}$$

Keterangan:

UA = Unit Aktivitas

Asp = Absorbansi Sampel

Ast = Absorbansi Standar

Abl = Absorbansi Blangko

T = Waktu

\*Aktivitas Protease APK1-S1-02

$$UA = \frac{0,37-0,001}{0,286-0,001} \times \frac{1}{0,25} = 5,2 \text{ U/ml}$$

\*Aktivitas Protease APK1-S1-03

$$UA = \frac{0,228-0,001}{0,286-0,001} \times \frac{1}{0,25} = 3,2 \text{ U/ml}$$

\*Aktivitas Protease APK1-S1-04

$$UA = \frac{0,491-0,001}{0,286-0,001} \times \frac{1}{0,25} = 6,9 \text{ U/ml}$$

