



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

EFEK SUHU INKUBASI DAN pH MEDIUM DALAM PRODUKSI AMILASE DARI ISOLAT BAKTERI TPT 20 TERMO-ALKALIFILIK

SKRIPSI



**DESRININGSIH
07133051**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT, atas izin-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Suhu Inkubasi Dan pH Medium Dalam Produksi Amilase Dari Isolat Bakteri TPT 20 Thermo-alkalifilik”. Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dan merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan studi di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Nasril Nasir dan Bapak Dr. Anthoni Agustien, M.S., yang telah memberikan petunjuk dan bimbingan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Ucapan terima kasih juga penulis tujukan kepada:

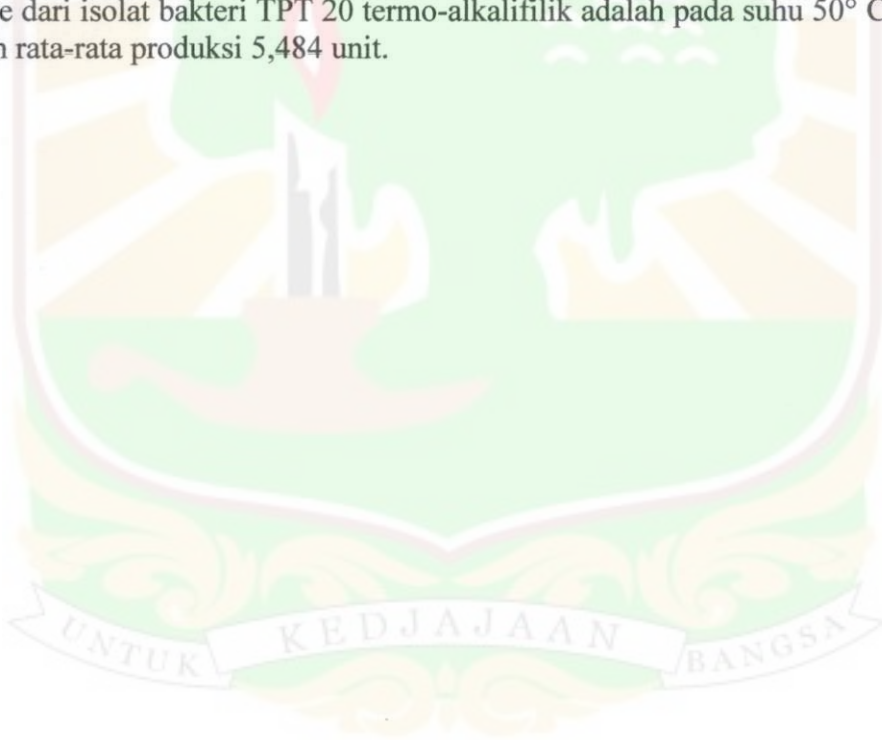
1. Bapak Ketua Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas
2. Bapak Kepala Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas
3. Bapak Kepala Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas
4. Bapak Muhammad Nazri Janra selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi kepada penulis
5. Bapak dan Ibu staf pengajar Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas
6. Civitas akademik Jurusan Biologi, Universitas Andalas
7. Semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian dan penulisan skripsi ini dapat diselesaikan.

Akhir kata penulis berharap semoga penelitian dan skripsi ini bermanfaat untuk perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan, serta dapat digunakan sebagai bahan penunjang untuk penelitian di masa yang akan datang.



ABSTRAK

Penelitian mengenai “Efek Suhu Inkubasi Dan pH Medium Dalam Produksi Amilase Dari Isolat Bakteri TPT 20 Termo-alkalifilik” telah dilaksanakan dari bulan Juni sampai Oktober 2011 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu panen enzim sebelum dan sesudah optimasi dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik dan untuk mengetahui suhu inkubasi dan pH medium optimum dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik. Penelitian ini menggunakan metoda deskriptif dan metoda eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam faktorial terdiri dari 2 faktor dan 2 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu panen enzim sebelum optimasi 10 jam sedangkan setelah optimasi menjadi 8 jam. Suhu inkubasi dan pH medium optimum dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik adalah pada suhu 50° C dan pH 8 dengan rata-rata produksi 5,484 unit.



ABSTRACT

The research on "The effect of Temperature of Incubation and pH Medium in Amylase Production From Bacteria Isolates TPT 20 Thermo-alkaliphilic" has held from June to October 2011 at the Laboratory of Microbiology and Plant Physiology Laboratory Department of Biology, Faculty of Mathematics and Sciences, University Andalas. This research aims to know the time of harvest of enzymes before and after optimization of amylase production from bacterial isolates TPT 20 Thermo-alkaliphilic. This research uses descriptive and the experimental method of Completely Randomized Design (CRD) in a factorial which consists of two factors and two replications. The results showed that the time enzyme before harvest the optimization ten hours, where as after optimization has become eight hours. Temperature of incubation medium and the pH optimum of amylase production from bacterial isolates TPT 20 thermo-alkaliphilic is at 50° C and pH 8 with an average of the production of 5.484 unit.



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan dan Manfaat	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Enzim	5
2.2. Enzim Amilase	6
2.3. Aktivitas Enzim.....	7
2.4. Bakteri Termofilik.....	8
2.5. Mikroorganisme Penghasil Amilase	9
2.6. Pertumbuhan Mikroba.....	10
III. PELAKSANAAN PENELITIAN	
3.1. Waktu dan Tempat.....	13
3.2. Metoda Penelitian.....	13
3.3. Alat dan Bahan.....	14
3.4. Cara Kerja.....	14

3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan	14
3.4.2. Pembuatan Medium Pati Agar	14
3.4.3. Pembuatan Medium Produksi Amilase	14
3.4.4. Uji Amilolitik	15
3.4.5. Peremajaan Bakteri	15
3.4.6. Penyediaan Inokulum	15
3.4.7. Penentuan Kurva Pertumbuhan	15
3.4.8. Uji Aktivitas Amilase	16
3.4.9. Pembuatan Kurva Standar Glukosa	16
3.4.10. Produksi Amilase	17
3.5. Analisa Data	17
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Karakteristik Isolat TPT 20 Termo-alkalifilik	18
4.2. Potensi Amilolitik	19
4.3. Kurva Pertumbuhan dan Kurva Aktivitas Amilase	20
4.4. Efek Suhu Inkubasi dan pH Medium Terhadap Produksi Amilase	22
4.5. Profil Kurva Pertumbuhan dan Kurva Aktivitas Amilase Setelah Optimasi	25
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	27
5.2. Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Jenis-jenis bakteri termofilik penghasil amilase	10
2. Kondisi-kondisi fisik yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri.....	11
3. Rata-rata Produksi Amilase (Unit) pada suhu inkubasi dan pH medium yang berbeda	22



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hidrolisis amilum oleh amilase.....	6
2. Aktivitas amilase isolat bakteri TPT-20 Termo-alkalifilik pada medium Pati agar setelah 48 jam inkubasi pada suhu 50 ⁰ C.....	19
3. Kurva pertumbuhan Isolat bakteri TPT-20 dan aktivitas amilase pada medium produksi Amilase dengan pH awal 8,0 dan suhu 60 ⁰ C.....	20
4. Efek suhu inkubasi terhadap produksi amilase pada pH medium 8.....	23
5. Efek pH medium terhadap produksi amilase pada suhu 50 ⁰ C.....	24
6. Kurva pertumbuhan isolat bakteri TPT-20 dan aktivitas amilase setelah optimasi.....	25
7. Biakan murni.....	45
8. Sampel pertumbuhan bakteri.....	45
9. Inokulum.....	45
10. Pengukuran pertumbuhan.....	45
11. Sampel kurva standar glukosa.....	45
12. Larutan kasar enzim.....	45
13. Enzim setelah dipanaskan.....	46
14. Enzim setelah ditambah reagen arsenomolibdat.....	46
15. Pengukuran aktivitas enzim.....	46
16. Produksi Enzim pada suhu 45 ⁰ C dan pH 7 – 9.....	46
17. Produksi Enzim pada suhu 50 ⁰ C dan pH 7 – 9.....	46
18. Produksi Enzim pada suhu 55 ⁰ C dan pH 7 – 9.....	47
19. Produksi Enzim pada suhu 60 ⁰ C dan pH 7 – 9.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	31
2. Penyediaan Reagen	32
3. Penentuan Kurva Standar Glukosa.....	33
4. Penentuan Aktivitas dan Produksi Enzim Amilase.....	36
5. Analisa Statistik Efek Suhu Inkubasi dan pH medium Terhadap Produksi Amilase	37
6. Analisa Statistik Efek Suhu Inkubasi dan pH medium Terhadap Produksi Amilase Setelah Ditransformasikan Dengan $x + 1$	38
7. Dokumentasi Penelitian	45



I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan protein khusus yang dapat bergabung dengan suatu substrat spesifik untuk mengkatalisasi reaksi biokimia dari substrat tersebut. Dalam suatu reaksi, enzim mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk suatu senyawa baru yang disebut produk. Enzim memiliki substrat spesifik dan reaksi kimia yang spesifik untuk dikatalisnya (Palmer, 1985).

Amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis atau pemecahan molekul amilum ini adalah molekul-molekul yang lebih kecil seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil (Reddy, Nimmagadda dan Rao, 2003). Amilase merupakan kelompok enzim yang sangat dibutuhkan dalam bidang industri, dengan pangsa pasar mencapai hampir 25% dari pasar enzim di dunia (Carvalho *et al.*, 2008). Penggunaan enzim amilase dalam industri sangat luas mulai dari industri pembuatan roti, sirup, pemanis, dekstrin, pembuatan etanol, pengujian limbah cair yang mengandung amilum, industri detergen, industri obat dan suplemen enzim (Palmer, 1985).

Enzim termostabil adalah enzim yang paling diinginkan oleh kebanyakan industri (Hewitt dan Solomons, 1996), karena stabil dan aktif pada suhu yang lebih tinggi (Saboto *et al.*, 1999). Mikroorganisme termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil. Bakteri termofilik dapat diisolasi dari lingkungan alam yang bersuhu tinggi yang tersebar di seluruh dunia dan ditemukan di daerah yang memiliki gunung berapi aktif (Brock, 1985).

Bakteri termofilik dapat diisolasi dari berbagai tempat seperti sumber-sumber geotermal, daerah vulkanik, pemandian mata air panas di darat maupun mata air panas di laut dalam dan juga dari proses pembuatan kompos (Brock, 1978). Bakteri termofilik mampu hidup secara optimal di atas suhu 45°C , dengan struktur protein penyusun enzim yang tetap stabil atau tidak terdenaturasi oleh panas. Mikroorganisme ini sendiri tidak hanya bersifat toleran terhadap suhu lingkungannya yang bersifat ekstrim tetapi juga mampu untuk bertahan hidup dan berkembangbiak pada kondisi suhu yang ekstrim tersebut (Brock, 1986).

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme yang bersifat heterotrof adalah nutrisi yang tersedia, suhu, pH, air, oksigen, potensial oksidasi reduksi, dan adanya zat-zat penghambat (Waluyo, 2007). Sedangkan produksi amilase tergantung pada temperatur, pH, waktu inkubasi, strain, komposisi media, pertumbuhan sel, nutrisi yang dibutuhkan, ion logam dan termostabilitas (Riaz, Haq dan Qadeer., 2003)

Diantara faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan produksi enzim, faktor suhu dan pH adalah faktor yang sangat penting. Masing-masing mikroorganisme mempunyai suhu optimum, minimum dan maksimum untuk pertumbuhannya. Hal ini disebabkan di bawah suhu minimum atau di atas suhu maksimum, aktivitas enzim yang dihasilkan mikroorganisme akan berhenti, bahkan pada suhu yang terlalu tinggi akan terjadi denaturasi enzim (Waluyo, 2007).

Nilai pH medium sangat berpengaruh pada jenis mikroorganisme yang tumbuh. Pada umumnya mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 3 sampai 6. Kebanyakan bakteri mempunyai pH optimum sekitar 6,5 sampai 7,5. Pada pH di bawah 5,0 dan di atas 8,5 bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik, kecuali bakteri asam asetat dan bakteri yang mengoksidasi sulfur. Batas pH untuk pertumbuhan mikroorganisme merupakan suatu gambaran dari batas pH kegiatan enzim. Menurut

Schlegel dan Schmidt (1994) dalam pertumbuhan apabila terjadi perubahan kadar pH yang kecil saja akan menimbulkan perubahan yang amat besar. Karena alasan itulah maka penggunaan pH awal yang optimum dan mempertahankannya sepanjang pertumbuhan adalah sesuatu yang amat penting.

Dari penelitian sebelumnya Alamri (2010) melaporkan bahwa amilase dari bakteri termofilik optimum diproduksi pada suhu 45⁰ C. Selanjutnya Teodoro dan Martins (2000) mengemukakan bahwa suhu optimum untuk produksi amilase dari bakteri termofilik adalah 50⁰ C. Sedangkan pH optimum dalam produksi amilase dari penelitian sebelumnya diperoleh beberapa hasil yaitu pH 7,0 (Vidyalakshmi, Paranthaman dan Indhumathi, 2009); pH 7,5 (Riaz *et al.*, 2003); pH 8,0 (Alamri, 2010) dan pH 8,5 (Carvalho *et al.*, 2008).

Isolat TPT 20 (Termofilik Protease Titi 20) merupakan bakteri termofilik dari sumber air panas Semurup, Jambi yang berindikasi menghasilkan amilase. Dibandingkan dengan isolat lain sebagai penghasil amilase isolat TPT 20 merupakan isolat yang mampu bertahan hidup dan memiliki zona proteolitik tertinggi. Isolat tersebut memiliki karakteristik berbentuk batang, Gram positif, tumbuh optimal pada suhu 60⁰ C dan pH 8,0 (Fitri, 2011).

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian mengenai efek suhu inkubasi dan pH medium dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik.

1.2. Perumusan Masalah

Dari latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Berapakah waktu panen enzim sebelum dan sesudah optimasi dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik?

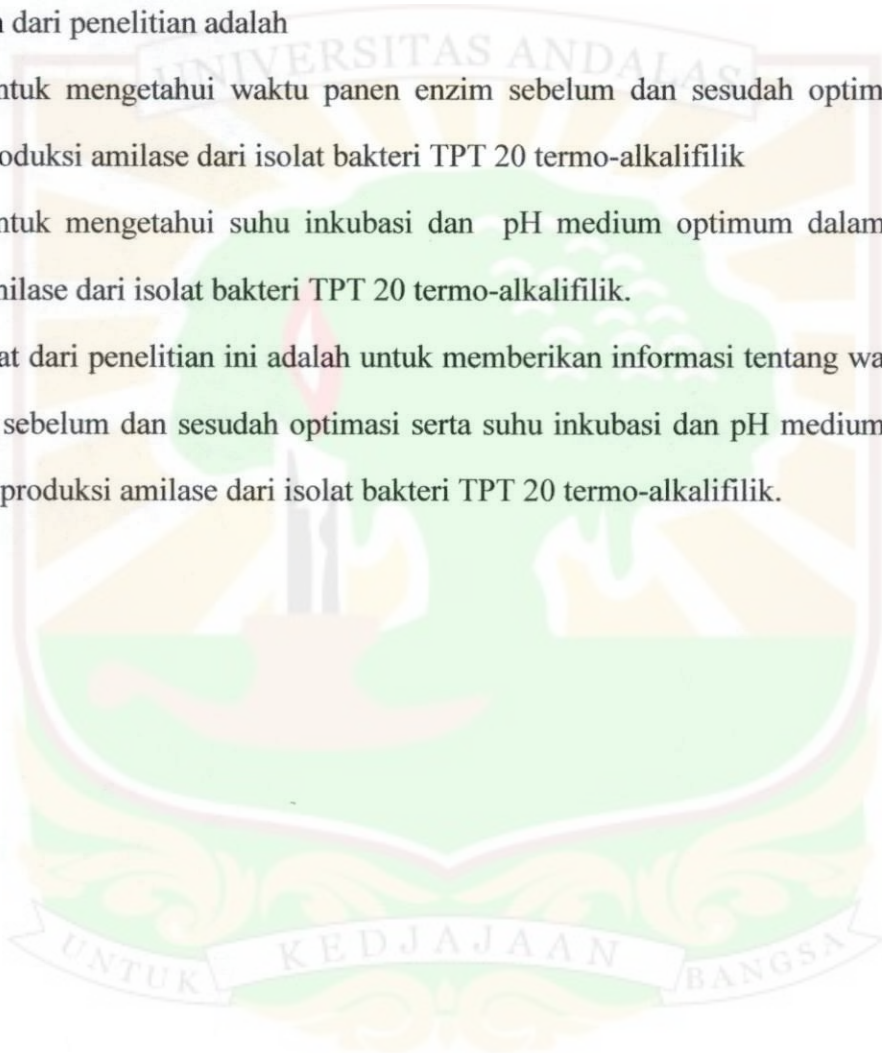
2. Berapakah suhu inkubasi dan pH medium optimum dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik?

1.3. Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian adalah

1. Untuk mengetahui waktu panen enzim sebelum dan sesudah optimasi dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik
2. Untuk mengetahui suhu inkubasi dan pH medium optimum dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik.

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi tentang waktu panen enzim sebelum dan sesudah optimasi serta suhu inkubasi dan pH medium optimum dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

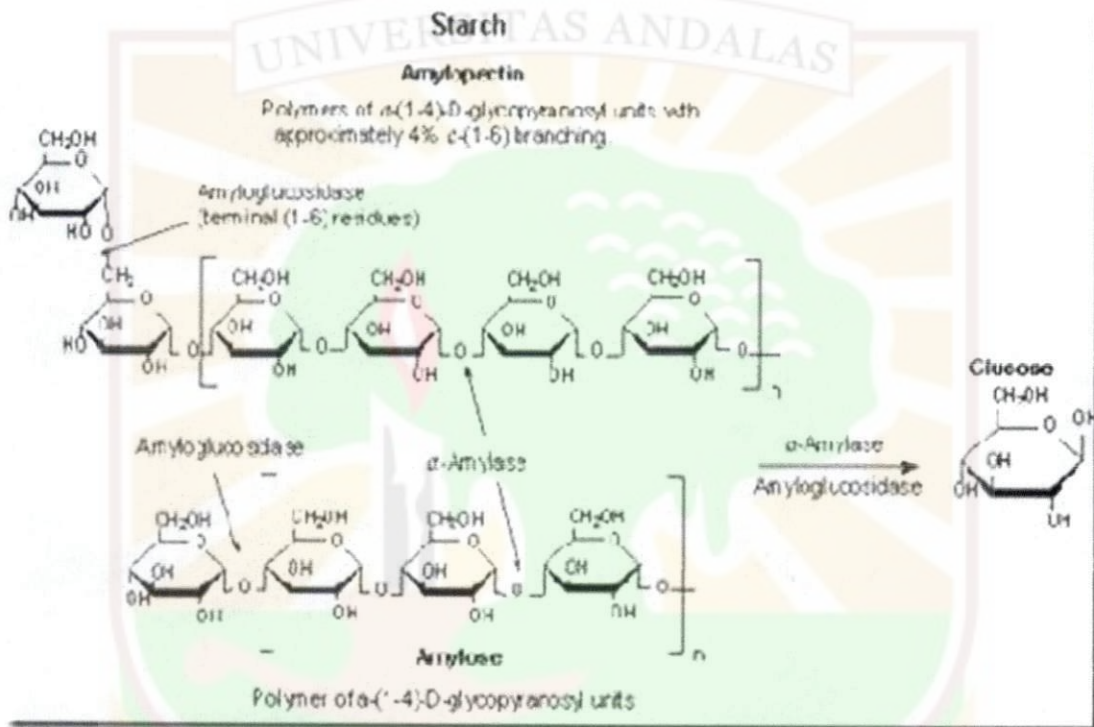
Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk mengkatalis reaksi yang berlangsung di dalamnya (Martoharsono, 1982). Enzim meningkatkan kecepatan yang dikatalis oleh faktor setinggi 10^8 sampai 10^{20} kali (Lehninger, 1982).

Enzim merupakan suatu substansi yang ada dalam sel dalam jumlah amat kecil dan mampu menyebabkan terjadinya perubahan-perubahan yang terkait dengan proses seluler dan kehidupan. Enzim dihasilkan oleh sel-sel hidup di dalam sel, namun beberapa enzim diekskresikan melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Jadi, dikenal dua tipe enzim yaitu enzim ekstraseluler atau eksoenzim (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler atau endoenzim (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama eksoenzim ialah melangsungkan perubahan-perubahan seperlunya pada nutrient di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrient tersebut memasuki sel. Misalnya, amilase menguraikan pati menjadi unit-unit gula yang lebih kecil. Enzim intraseluler mensintesis bahan seluler dan juga menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel. Misalnya, heksokinase mengkatalis fosforilasi glukose dan heksose (senyawa-senyawa gula sederhana) di dalam sel (Pelczar dan Chan, 1986).

Enzim disintesa oleh sel hidup untuk mengkatalisa reaksi yang berlangsung di dalamnya, berfungsi sebagai biokatalisator yang berperan mengkatalisis reaksi-reaksi spesifik karena mempunyai aktivitas katalitik (Lehninger, 1982). Katalis adalah substansi yang digunakan dalam jumlah sedikit namun dapat mempercepat berlangsungnya reaksi kimia (Pelczar *et al.*, 1986).

2.2. Enzim Amilase

Amilase merupakan enzim yang berfungsi memecah pati atau glikogen (Winarno, 1995). Menurut Waluyo, 2007 amilase adalah enzim yang menguraikan amilum menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti glukosa.



Gambar 1. Hidrolisis amilum oleh amilase (Anonymous, 2011)

Amilase dapat dikelompokkan menjadi :

1. α -amilase (EC 3.2.1.1.), yang memecah pati secara acak dari tengah atau dari bagian dalam molekul sehingga disebut endoamilase. Enzim α -amilase terdapat pada tanaman, jaringan mamalia, dan mikroba. α -amilase murni dapat diperoleh dari berbagai sumber, misalnya dari *malt* (barley), kelenjar ludah manusia, dan pankreas. Dapat juga diisolasi dari *Aspergillus oryzae* dan *Bacillus subtilis*. Cara kerja α -amilase terjadi melalui dua tahap: pertama, degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak dan yang kedua pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir.

2. β -amilase (EC 3.2.1.2.), yang menghidrolisis unit-unit gula dari ujung molekul pati sehingga disebut eksoamilase. β -amilase terdapat pada berbagai hasil tanaman, tetapi tidak terdapat pada mamalia dan mikroba. Secara murni telah dapat diisolasi dari kecambah barley, ubi jalar, dan kacang kedelai.
3. Glukoamilase, yang dapat memisahkan glukosa dari terminal gula non-pereduksi substrat pati. Glukoamilase memecah pati dari luar dengan mengeluarkan unit-unit glukosa dari ujung bukan pereduksi polimer pati. Hasil reaksinya hanya glukosa sehingga dapat dibedakan dengan α -amilase dan β -amilase. Secara komersil diproduksi dari *Aspergillus* dan *Rhizopus*, dapat memecah ikatan α -1,3 dan α -1,4 (Winarno, 1995).

2.3. Aktivitas Enzim

Keadaan-keadaan yang mempengaruhi aktivitas enzim diantaranya ialah konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH dan suhu. Setiap enzim berfungsi secara optimal pada pH dan temperatur tertentu. Keragaman pH yang ekstrim bahkan dapat merusak enzim seperti itu juga dengan suhu yang tinggi; pendidihan beberapa menit akan mendenaturasi (menghancurkan) kebanyakan enzim. Mulai pada suatu suhu terendah, aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai aktivitas optimumnya dicapai. Kenaikan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas dan pada akhirnya perusakan enzim. Suhu yang sangat rendah praktisnya dapat menghentikan aktivitas enzim tetapi tidak menghancurkannya. Banyak enzim dapat diawetkan dengan cara menyimpannya pada suhu sekitar 0°C atau kurang. (Pelczar, *et al.*, 1986).

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal. Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam

tingkat ionisasi yang diinginkan. pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit berada di atas atau di bawah pH optimum. Aktivitas katalitik enzim di dalam sel diatur sebagian oleh perubahan pada pH medium (Lehninger, 1982).

Aktivitas enzim bakteri (sel atau jaringan) apa saja dapat ditentukan melalui beberapa teknik. Beberapa prosedur membutuhkan alat-alat khusus dan rumit sedangkan yang lain hanya membutuhkan sebuah tabung reaksi dan beberapa reagen. Semuanya didasarkan pada beberapa prinsip sederhana. Untuk menguji aktivitas enzim secara kuantitatif salah satunya perlu diketahui metoda analitik sederhana untuk menentukan munculnya produk-produk reaksi (Pelczar *et al.*, 1986).

2.4. Bakteri Termofilik

Mikroorganisme dapat dibagi menjadi 3 golongan berdasarkan temperatur aktivitasnya yaitu : (1.) Mikroorganisme psikrofil yaitu golongan mikroorganisme yang dapat tumbuh pada daerah temperatur antara 0°C sampai 30°C , dengan temperatur optimum 15°C . Kebanyakan dari golongan ini tumbuh di tempat-tempat dingin, (2.) Mikroorganisme mesofil yaitu golongan mikroorganisme yang mempunyai temperatur optimum pertumbuhan antara 25°C sampai 37°C ; minimum 15°C dan maksimum diantara 45°C sampai 55°C . Umumnya hidup di dalam alat pencernaan, (3) Mikroorganisme termofil merupakan golongan mikroorganisme yang dapat tumbuh pada daerah temperatur tinggi, dengan nilai optimum antara 55°C sampai 60°C ; minimum 40°C sedangkan maksimum 75°C . Golongan ini terutama terdapat di dalam sumber-sumber air panas dan tempat-tempat lain yang bertemperatur lebih tinggi dari 55°C (Suriawiria, 1980).

Bakteri termofilik adalah bakteri yang pertumbuhan optimumnya terjadi di atas suhu 45°C atau 50°C . Bahkan beberapa diantaranya tumbuh pada suhu di atas

95⁰ C. Organisme dalam kelompok termofil hidup di alam di tempat-tempat seperti sumber air panas atau tumpukan sampah yang membusuk yang telah menimbulkan panas yang cukup tinggi sebagai akibat metabolismenya (Volk dan Wheeler, 1988).

Bakteri termofilik dibagi atas 3 kelompok berdasarkan suhu pertumbuhannya, yaitu :

1. Termofilik fakultatif, memiliki suhu maksimum antara 50⁰ C sampai 65⁰ C dan tidak dapat tumbuh pada suhu di bawah 30⁰ C, contoh kelompok ini antara lain *Bacillus coagulans* dan beberapa strain *Bacillus stearothermophilus*.
2. Termofilik obligat, memiliki suhu maksimum 65⁰ C sampai 70⁰ C dan tidak dapat hidup di bawah suhu 40⁰ C sampai 42⁰ C. Contoh kelompok ini adalah beberapa strain *Bacillus stearothermophilus*.
3. Termofilik ekstrem, memiliki suhu maksimum lebih dari 70⁰ C dengan suhu optimum lebih besar dari 65⁰ C dan suhu minimum lebih dari 40⁰ C. Contohnya *Bacillus caldolyticus* dan *Thermus thermophilus* (Friedman, 1992).

2.5. Mikroorganisme Penghasil Amilase

Amilase mula-mula ditemukan oleh Kirchoff pada tahun 1811 dari gandum. Sampai saat ini sumber amilase yang terbanyak ditemukan dari mikroorganisme, kemudian tumbuh-tumbuhan dan hewan (Linko dan Wu, 1993). Mikroorganisme yang menghasilkan amilase berasal dari golongan bakteri dan fungi, yaitu menghasilkan α -amilase. Sedangkan β -amilase hanya terdapat pada tumbuh-tumbuhan (Schlegel *et al.*, 1994). Glukoamilase jarang ditemukan pada bakteri, glukoamilase dihasilkan oleh beberapa fungi seperti *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, dan *R. Javanicus* (Cruger dan Anneliese, 1984 *cit* Sutiamiharja, 2008)

Bakteri yang merupakan produsen aktif amilase adalah jenis bakteri basil (*Bacillus mecerans*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*), *Pseudomonas* dan beberapa

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS

Streptomyces. Bahkan enzim yang diekskresikan oleh *B. stearothermophilus* termofilik tahan terhadap pemanasan 100⁰ C (Schlegel *et al.*, 1994). Beberapa bakteri termofilik yang dapat menghasilkan amilase ditampilkan pada Tabel. 1.

Tabel 1. Jenis-jenis bakteri termofilik penghasil amilase (Friedman, 1992)

Jenis	Suhu optimum (⁰ C)	pH optimum
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	70	3,5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	50-70	5,5
<i>Bacillus caldolyticus</i>	70	5,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	90	7,0-9,0
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	5,0-6,0
<i>Clostridium thermoamylolyticum</i>	50	6,0
<i>Thermus aquaticus</i>	70	5,5
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	85	5,0

2.6. Pertumbuhan Mikroba

Pertumbuhan artinya penambahan substansi hidup yang tidak reversibel, biasanya disertai penambahan ukuran dan pembelahan sel. Pada organisme bersel banyak, ukurannya bertambah sedangkan pada organisme bersel satu jumlah selnya yang bertambah. Meskipun demikian pada organisme bersel satu harus dibedakan penambahan jumlah atau bertambahnya massa sel (Schlegel *et al.*, 1994).

Semua proses pertumbuhan bergantung pada reaksi kimiawi dan karena laju reaksi-reaksi ini dipengaruhi oleh suhu, maka pola pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh suhu. Suhu juga mempengaruhi laju pertumbuhan dan jumlah total pertumbuhan organisme. Keragaman suhu dapat juga mengubah proses-proses metabolik tertentu serta morfologi sel (Pelczar *et al.*, 1986).

Setiap spesies bakteri tumbuh pada suatu kisaran suhu tertentu. Atas dasar ini maka bakteri dapat diklasifikasikan sebagai : psikrofil yang tumbuh pada 0⁰ C sampai 30⁰ C, mesofil yang tumbuh pada 25⁰ C sampai 40⁰ C dan termofilik yang tumbuh pada suhu 50⁰ C atau lebih. Respon pertumbuhan kelompok-kelompok bakteri ini dapat dilihat pada Tabel 2. Suhu inkubasi yang memungkinkan pertumbuhan tercepat

selama periode waktu yang singkat (12 sampai 24 jam) dikenal sebagai suhu pertumbuhan optimum (Pelczar *et al.*, 1986).

Selain suhu yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah pH. pH optimum pertumbuhan bagi kebanyakan bakteri terletak antara 6,5 dan 7,5. Namun, beberapa spesies dapat tumbuh dalam keadaan sangat masam atau sangat alkalin. Bagi kebanyakan spesies nilai pH minimum dan maksimum ialah 4 dan 9 (Pelczar *et al.*, 1986).

Tabel 2. Kondisi-kondisi fisik yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Pelczar *et al.*, 1986).

Kondisi Fisik	Tipe Bakteri (Kelompok Fisiologis)	Kondisi Biakan (inkubasi)
Suhu (kisaran pertumbuhan minimum dan maksimum, optimumnya pada suatu titik di dalam kisaran bergantung spesies.	Psikrofil	0 – 30 ⁰ C
	Mesofil	25 – 40 ⁰ C
	Termofil	
	<ul style="list-style-type: none"> • Termofil fakultatif (bebas pilih) • Termofil obligat 	25 – 55 ⁰ C 45 – 75 ⁰ C
Keasaman atau alkalinitas (pH)	Kebanyakan bakteri berkaitan dengan kehidupan hewan dan tumbuhan.	pH optimum 6,5–7,5
	Beberapa spesies eksotik.	pH minimum 0,5 pH maksimum 9,5

Dalam mempelajari laju pertumbuhan biakan bakteri, hasilnya dapat diproyeksikan sebagai logaritme jumlah sel terhadap waktu pertumbuhan. Dengan cara ini kurva pertumbuhan bakteri yang diperoleh dapat dibagi menjadi empat fase, yaitu :

1. Fase tenggang (Lag phase)

Pada fase tenggang sel mulai mensintesis enzim-enzim yang dapat dirangsang dan menggunakan cadangan makanan. Fase tenggang adalah periode penyesuaian pada lingkungan dan lamanya dapat satu jam hingga beberapa hari.

2. Fase logaritma (log/eksponensial)

Fase ini adalah periode pembiakan yang cepat dan merupakan periode yang di dalamnya biasanya teramati ciri khas sel-sel yang aktif. Selama fase inilah waktu generasi tetap tak berubah bagi setiap jenis; jika dibuat proyeksi logaritma jumlah organisme terhadap waktu, fase log ini muncul sebagai garis lurus.

3. Fase stasioner

Fase stasioner merupakan fase dimana laju pembiakan sama dengan laju kematian, jumlah keseluruhan bakteri akan tetap. Pada fase ini terjadi penyusutan nutrisi dalam medium, selain itu produk limbah metabolisme cenderung menumpuk dan mungkin menjadi racun bagi organisme.

4. Fase kematian

Apabila laju kematian melampaui laju pembiakan, jumlah bakteri menurun. Pada fase kematian ini, biasanya pembiakan berhenti (Volk *et al.*, 1988).

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Oktober 2011 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

3.2. Metoda Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metoda deskriptif dan metoda eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor perlakuan dan 2 kali ulangan, yaitu :

Faktor A. Suhu inkubasi

A1 : Suhu 45⁰ C

A2 : Suhu 50⁰ C

A3 : Suhu 55⁰ C

A4 : Suhu 60⁰ C

Faktor B. pH medium

B1 : pH 7

B2 : pH 7,5

B3 : pH 8

B4 : pH 8,5

B5 : pH 9

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS

3.3. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Autoclave, test tube, petridish, Erlemeyer, sentrifus, pipet tetes, spektrofotometer, pH meter, magnetik stirer, hot plate, bunsen, jarum ose, shaker, inkubator, termometer Vortex, waterbath dan alat tulis. Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik, Aquades steril, Medium Pati Agar, Medium Produksi Amilase, Pati, lugol, glukosa, kapas, kain kasa, alkohol, spritus, aluminium foil, buffer fosfat, pereaksi Somogy-Nelson dan pereaksi Arsenomolibdat.

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan disterilisasi dengan menggunakan autoclave 121°C pada tekanan 15 lbs selama 15 menit (Lay, 1994).

3.4.2. Pembuatan Medium Pati Agar

Dilarutkan 10 gr pati (amilum) dan 15 gr agar dalam 1 liter aquades steril, lalu dipanaskan hingga homogen, kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit (Lay, 1994).

3.4.3. Pembuatan Medium Produksi Amilase

Dilarutkan 3 gr NaNO_3 , 5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 gr NaCl , 0,1 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 10 gr pati dalam 1 liter aquades steril, lalu dipanaskan hingga homogen menggunakan magnetik stirer. Untuk variasi pH dilakukan penambahan HCl 0,1 M dan NaOH 0,1 M serta diukur menggunakan pH meter. Kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit (Agustien, 2005).

3.4.4. Uji Amilolitik

Isolat TPT 20 diinokulasikan ke medium pati agar 1 %, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 60⁰ C, kemudian cawan petri ditetesi lugol, jika terbentuk zona bening maka dapat diindikasikan bakteri menghasilkan amilase (Lay, 1994).

3.4.5. Peremajaan Bakteri

Biakan murni isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Isolat bakteri TPT 20 termofilik ini merupakan hasil isolasi dari sumber air panas Semurup, Jambi (Fitri, 2011 belum dipublikasikan), kemudian diremajakan dengan menginokulasikannya sebanyak 1 ose pada biakan miring medium Pati Agar secara aseptis, lalu diinkubasi pada suhu 50⁰ C selama 24 jam kemudian disimpan sebagai stok bakteri (Atlas, 1997).

3.4.6. Penyediaan Inokulum

Sebanyak 2 ose biakan murni bakteri diinokulasikan ke dalam erlemeyer yang berisi 50 ml media produksi amilase. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 150 rpm dan suhu 60⁰ C (Jusuf dan Nurdjannah, 1994 *cit* Hayati, 1998)

3.4.7. Penentuan Kurva Pertumbuhan

Penentuan kurva tumbuh dilakukan dengan mengambil sebanyak 2 ml inokulum, kemudian dimasukkan ke dalam 100 ml medium produksi amilase pada erlemeyer 250 ml, kemudian ditambahkan 1 gr pati. Setelah itu dishaker pada suhu 60⁰ C dengan kecepatan 150 rpm. Setiap selang waktu 2 jam sampel diambil sebanyak 3 ml dan diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Saat pertumbuhan bakteri sudah mencapai stasioner dilakukan pencuplikan sampel. Pengambilan sampel dihentikan setelah nilai absorbansi terus

menurun (menuju fase kematian). Nilai absorbansi yang didapat digambarkan dalam bentuk kurva pertumbuhan. Kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas enzim terhadap sampel pada fase stasioner untuk penentuan masa inkubasi terbaik dalam produksi amilase (Nascimento dan Martins, 2004).

3.4.8. Uji Aktivitas Amilase

Aktivitas amilase yang dihasilkan oleh Isolat bakteri TPT 20 termofilik ditentukan berdasarkan Darwis dan Sukara (1990) *cit* Hayati (1998) sebagai berikut :

Larutan pati 1% sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi (pra-inkubasi) pada suhu 60°C selama 10 menit, lalu dimasukkan larutan kasar enzim sebanyak 0,1 ml dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 ml pereaksi Somogy-Nelson dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, selanjutnya didinginkan. Kemudian ditambahkan pereaksi Arsenomolibdat sebanyak 1 ml dan 6,9 ml air suling lalu dikocok. Setelah itu ditentukan serapan cahaya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Untuk blanko caranya sama dengan perlakuan sampel, hanya pada blanko ekstrak kasar enzim 0,1 ml yang digunakan terlebih dahulu dinonaktifkan dengan cara memanaskannya pada suhu 100°C dalam penangas air selama 10 menit. Aktivitas enzim didapatkan dengan cara mengkonversikan absorbansi sampel dengan kurva standar glukosa. Dimana 1 unit aktivitas enzim mengandung pengertian jumlah enzim yang mampu mengkatalisis perubahan satu mikromol substrat per menit.

3.4.9. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat dengan memvariasikan konsentrasi glukosa menjadi 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Masing-masing perlakuan di atas diambil 1 ml dan ditambahkan 1 ml reagen Somogy-Nelson dan reagen Arsenomolibdat, kemudian dicukupkan volumenya menjadi 10 ml dengan penambahan air suling. Lalu diukur

absorbannya pada panjang gelombang 600 nm. Kemudian dibuat kurva standarnya (Darwis *et al.*, 1990 *cit* Hayati, 1998)

3.4.10. Produksi Amilase

Produksi amilase yang dihasilkan oleh isolat bakteri TPT 20 termofilik ditentukan berdasarkan Agustien (2005) sebagai berikut :

Disiapkan biakan murni bakteri yang telah diremajakan, kemudian diinokulasikan 1-2 ose pada 100 ml medium produksi amilase pH 8. Inkubasi pada suhu 50⁰ C selama waktu panen (dari hasil panen kurva pertumbuhan). Selanjutnya dipipet 5 ml inokulum 10⁷ sel/ml pada medium produksi amilase. Inkubasi pada suhu 50⁰ C selama waktu panen. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 15 menit, supernatan yang diperoleh diuji aktivitas amilase. Untuk efek suhu inkubasi terhadap produksi amilase, dilakukan pada variasi suhu 45⁰ C, 55⁰ C dan 60⁰ C. Sedangkan untuk efek pH medium dilakukan pada variasi pH 7,0; pH 7,5; pH 8,5 dan pH 9,0 pada suhu optimum.

Produksi amilase dapat dihitung dengan rumus :

$$\begin{aligned} \text{Produksi amilase} &= \text{Aktivitas enzim} \times \text{Volume supernatan} \\ &= \text{Unit/ml} \times \text{ml} \\ &= \text{Unit} \end{aligned}$$

3.5. Analisa Data

Data yang didapatkan dari efek suhu inkubasi dan pH medium terhadap produksi amilase dianalisa secara statistik dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan 2 kali ulangan. Apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan maka analisis sidik ragam dilanjutkan dengan uji Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf 5 %.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari Penelitian yang telah dilakukan tentang Efek Suhu Inkubasi dan pH Medium Dalam Produksi Amilase Dari Isolat Bakteri TPT 20 Termo-alkalifilik didapatkan hasil sebagai berikut :

4.1. Karakteristik Isolat TPT 20 Termo-alkalifilik

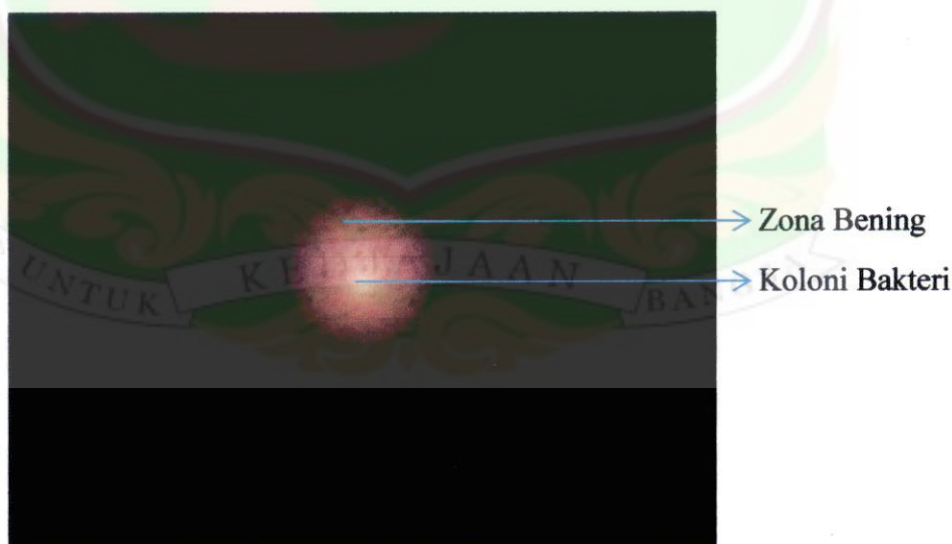
Dari penelitian sebelumnya mengenai “Isolasi dan Karakterisasi Parsial *Bacillus* sp. Termo-alkalifilik Proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup, Jambi” oleh Fitri (2011) diketahui bahwa isolat TPT 20 Termo-alkalifilik merupakan isolat yang memiliki indeks proteolitik tertinggi yaitu 13. Selain itu dari penelitian tersebut juga diperoleh karakteristik dari isolat TPT 20 Termo-alkalifilik baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Secara makroskopis bakteri ini memiliki koloni yang berbentuk bulat dengan ukuran koloni 0,1 cm, pinggir koloni beraturan, warna koloni putih susu, dan permukaan koloni licin. Sedangkan secara mikroskopis bakteri ini selnya berbentuk batang, berukuran 20 μm , gram positif, dan bentuk spora bulat dengan tipe subterminal. Karakter lain dari isolat ini yaitu motil dan bersifat aerob. Dari uji enzimatik bakteri TPT 20 memiliki kemampuan menghasilkan amilase, katalase, lipase dan protease.

Isolat TPT 20 mampu hidup pada kisaran suhu 45°C – 90°C dengan suhu pertumbuhan optimum pada suhu 60°C . Hal ini disebabkan isolat TPT 20 berasal dari sumber air panas yang bersuhu 58°C , sehingga mampu hidup dengan pertumbuhan maksimal pada suhu 60°C . Selain itu isolat TPT 20 mampu hidup pada pH 5 – 10 dengan pertumbuhan optimum pada pH 8 sehingga bakteri ini dikelompokkan bakteri yang bersifat alkalifilik (Fitri, 2011)

4.2. Potensi Amilolitik

Pengujian amilolitik isolat TPT 20 yang dilakukan pada medium pati agar, menunjukkan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Hal ini berarti bakteri berindikasi menghasilkan enzim amilase ekstraseluler. Menurut Fardiaz (1993) koloni pemecah pati (bersifat amilolitik) yang tumbuh pada medium Pati Agar, jika ditetesi larutan Gram Zodium (Lugol) akan membentuk bagian yang transparan (tidak berwarna atau berwarna kekuning-kuningan) di sekelilingnya yang menandakan terjadinya hidrolisis pati oleh enzim amilase. Koloni yang tidak memecah pati akan tetap berwarna biru karena reaksi antara pati dan zodium.

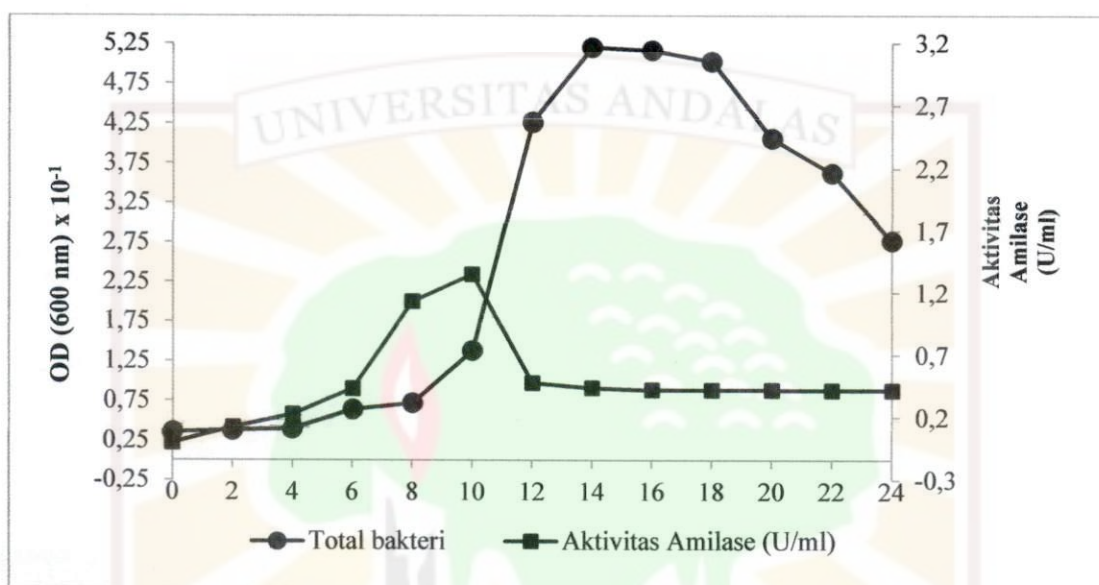
Gambar 2 menunjukkan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni isolat bakteri TPT 20 Termo-alkalifilik. Dengan adanya enzim amilase ekstraseluler dari bakteri, pati yang terdapat di dalam medium pati agar akan terhidrolisis. Menurut Cappuccino (1983) zona bening yang terbentuk di sekeliling isolat menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut telah menghidrolisis pati di bagian media pati tersebut.



Gambar 2. Aktivitas amilase isolat bakteri TPT-20 Termo-alkalifilik pada medium pati agar setelah 48 jam inkubasi pada suhu 50⁰ C.

4.3. Kurva Pertumbuhan dan Kurva Aktivitas Amilase

Pengamatan profil kurva pertumbuhan isolat bakteri TPT 20 dan kurva aktivitas amilase disajikan seperti pada Gambar 3 dibawah ini.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan Isolat bakteri TPT-20 dan aktivitas amilase pada medium produksi Amilase dengan pH awal 8,0 dan suhu 60°C .

Kurva pertumbuhan isolat bakteri TPT 20 (Gambar 3) menunjukkan fase lag dimulai dari 0 – 4 jam, kemudian fase eksponensial dari jam ke 4 – 14, dengan jumlah bakteri paling tinggi pada jam ke 14. Selanjutnya bakteri masuk fase stasioner sampai jam ke 18. Sedangkan fase kematian terjadi setelah jam ke 18.

Waktu adaptasi dari isolat TPT 20 ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan medium yang digunakan sebagai inokulum (starter) untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan medium produksi sehingga fase lag (penyesuaian) relatif lebih singkat. Menurut Waluyo (2007) lamanya fase adaptasi dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah medium, sel yang ditempatkan pada medium yang sama seperti medium sebelumnya memerlukan waktu adaptasi yang singkat. Selain itu dari hasil pengamatan kurva pertumbuhan juga terlihat bahwa pada fase ini amilase sudah mulai dihasilkan. Menurut Volk *et al.* (1988) fase lag lamanya dapat

satu jam hingga beberapa hari dan pada fase ini sel mulai mensintesis enzim-enzim yang dapat dirangsang dan menggunakan cadangan makanan.

Selanjutnya isolat bakteri TPT 20 memasuki fase eksponensial, pada fase ini sel mulai membelah dengan kecepatan tinggi dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang eksponensial. Menurut Waluyo (2007) setelah bakteri menyesuaikan diri dengan lingkungan, yakni pada fase adaptasi dan fase permulaan pembiakan, maka sel membelah dengan cepat, dimana pertambahan jumlahnya mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini sel membutuhkan energi lebih banyak dibandingkan fase lainnya.

Setelah fase eksponensial bakteri mengalami fase stasioner dan diikuti oleh fase kematian. Pada fase ini zat makanan yang diperlukan bakteri mulai berkurang dan energi cadangan di dalam sel habis sehingga mengakibatkan terganggunya perkembangan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya.

Gambar 3 juga menunjukkan aktivitas enzim amilase yang dimulai pada jam ke 2 sampai jam ke 24. Aktivitas enzim amilase tertinggi pada jam ke 10 (fase eksponensial). Berarti waktu panen enzim adalah jam ke 10. Setelah jam ke 10 enzim turun drastis, hal ini menunjukkan bahwa enzim amilase isolat bakteri TPT 20 tidak stabil.

Dari waktu mulai terukurnya aktivitas dan waktu panen enzim amilase menunjukkan bahwa amilase isolat bakteri TPT 20 termasuk metabolit primer. Menurut Crueger dan Crueger (1984), metabolit primer dihasilkan mikroorganisme pada saat pertumbuhan eksponensial dan metabolit sekunder dihasilkan pada fase stasioner. Vidyalaksmi (2009) juga melaporkan bahwa amilase maksimum dihasilkan pada jam ke-10 inkubasi.

Setelah mencapai aktivitas optimum enzim mengalami penurunan yang sangat drastis, hal ini memperlihatkan bahwa enzim amilase yang dihasilkan oleh

isolat TPT 20 tidak bersifat termostabil pada suhu 60⁰ C dan pH 8. Hal yang berbeda ditunjukkan oleh kurva aktivitas enzim protease dari *Brevibacillus agri* A-03 yang stabil dimana setelah mencapai aktivitas optimum aktivitas enzim masih terlihat konstan meskipun mengalami penurunan (Agustien, 2010). Selain itu hal ini juga dapat disebabkan karena setelah mencapai aktivitas optimum kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis pati menjadi glukosa oleh enzim sudah mencukupi kebutuhan bakteri sehingga bakteri tidak perlu lagi untuk menghasilkan enzim untuk menghidrolisis pati. Amilase yang dihasilkan oleh isolat TPT 20 merupakan eksoenzim yang akan merubah pati menjadi molekul yang lebih sederhana yaitu glukosa sehingga memungkinkan untuk diserap oleh sel bakteri. Menurut Pelczar dan Chan (1986), fungsi utama eksoenzim ialah melangsungkan perubahan-perubahan seperlunya pada nutrient di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrient tersebut memasuki sel.

4.4. Efek Suhu Inkubasi dan pH Medium Terhadap Produksi Amilase

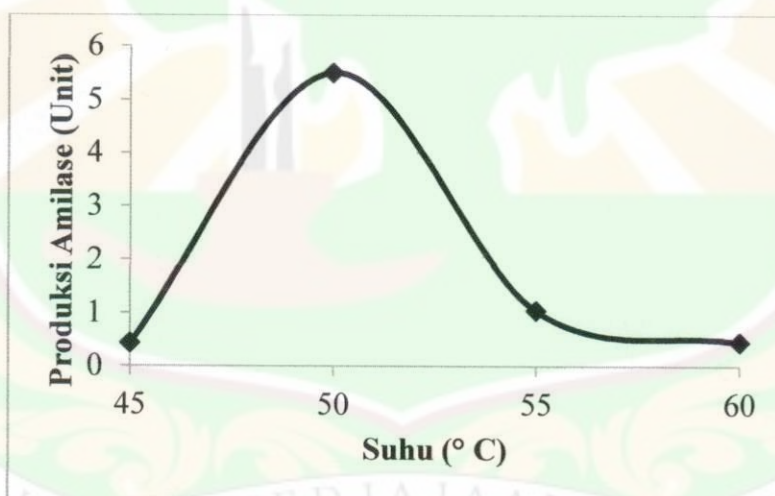
Hasil pengujian efek suhu inkubasi dan pH medium terhadap produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 secara statistik menunjukkan perbedaan yang nyata dimana $F_{hitung} > F_{tabel}$ (Lampiran 6). Interaksi faktor suhu inkubasi dan pH medium berdasarkan uji Duncan's disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata Produksi Amilase (Unit) pada suhu inkubasi dan pH medium yang berbeda.

Suhu Inkubasi	pH Medium				
	pH 7	pH 7,5	pH 8	pH 8,5	pH 9
45 ⁰ C	0,397 m	0,426 j	0,427 j	0,421 jk	0,403 l
50 ⁰ C	1,624 d	3,580 b	5,484 a	0,939 g	0,414 k
55 ⁰ C	0,716 h	1,059 f	1,049 f	1,750 c	1,602 e
60 ⁰ C	0,431 j	0,401 l	0,445 i	0,431 j	0,421 jk

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama ke segala arah tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf DN MRT 5 %.

Tabel 3 menunjukkan bahwa setiap perlakuan memperlihatkan rata-rata produksi amilase yang berbeda nyata satu sama lainnya, kecuali pada perlakuan suhu 55°C pH 7,5 dan perlakuan suhu 55°C pH 8; perlakuan suhu 45°C pH 7,5, perlakuan suhu 45°C pH 8, perlakuan suhu 60°C pH 7 dan perlakuan suhu 60°C pH 8,5; perlakuan suhu 45°C pH 8,5 dan perlakuan suhu 60°C pH 9; serta perlakuan suhu 45°C pH 9 dan perlakuan suhu 60°C pH 7,5. Pada perlakuan suhu 50°C dan pH medium 8 menunjukkan rata-rata produksi amilase paling tinggi yaitu 5,484 Unit, sedangkan perlakuan dengan suhu 45°C dan pH medium 7 menunjukkan rata-rata produksi amilase paling rendah yaitu 0,397 Unit. Efek suhu inkubasi dan pH medium terhadap produksi amilase lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5.

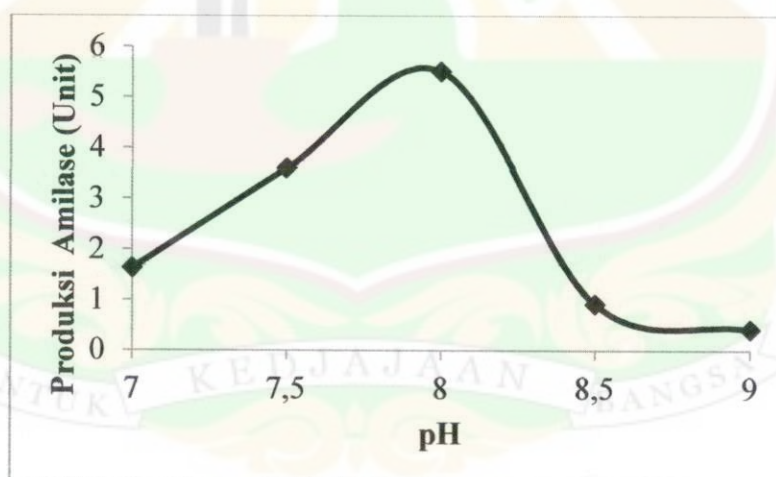


Gambar 4. Efek suhu inkubasi terhadap produksi amilase pada pH medium 8.

Gambar 4 menunjukkan bahwa produksi amilase mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan suhu inkubasi, dan setelah suhu optimum produksi amilase tercapai maka laju katalitik enzim mengalami penurunan. Selain itu Gambar 4 juga menunjukkan bahwa isolat bakteri TPT-20 ini menghasilkan amilase pada rentang suhu $45\text{-}60^{\circ}\text{C}$. Laju reaksi optimum pada suhu 50°C dan laju reaksi enzimatik mengalami penurunan pada suhu di atas 50°C bahkan bisa mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya. Menurut Pelczar *et al.* (1986) mulai pada suhu rendah,

aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai aktivitas optimumnya dicapai. Kenaikan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas dan pada akhirnya merusak enzim. Martoharsono (1982) menyatakan bahwa suhu mempunyai dua pengaruh yang berlawanan, pertama suhu akan menaikkan aktivitas enzim, sebaliknya juga mendenaturasi enzim.

Teodoro dan Martins (2000) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. mampu menghasilkan amilase pada rentang aktivitas suhu 30-55⁰ C dan optimum pada suhu 50⁰ C dan penurunan laju reaksi enzimatik terjadi pada suhu diatas suhu 50⁰ C. Hal ini dikarenakan terjadinya denaturasi enzim. Menurut Poedjiadi (2006) kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan menurun



Gambar 5. Efek pH medium terhadap produksi amilase pada suhu 50⁰ C

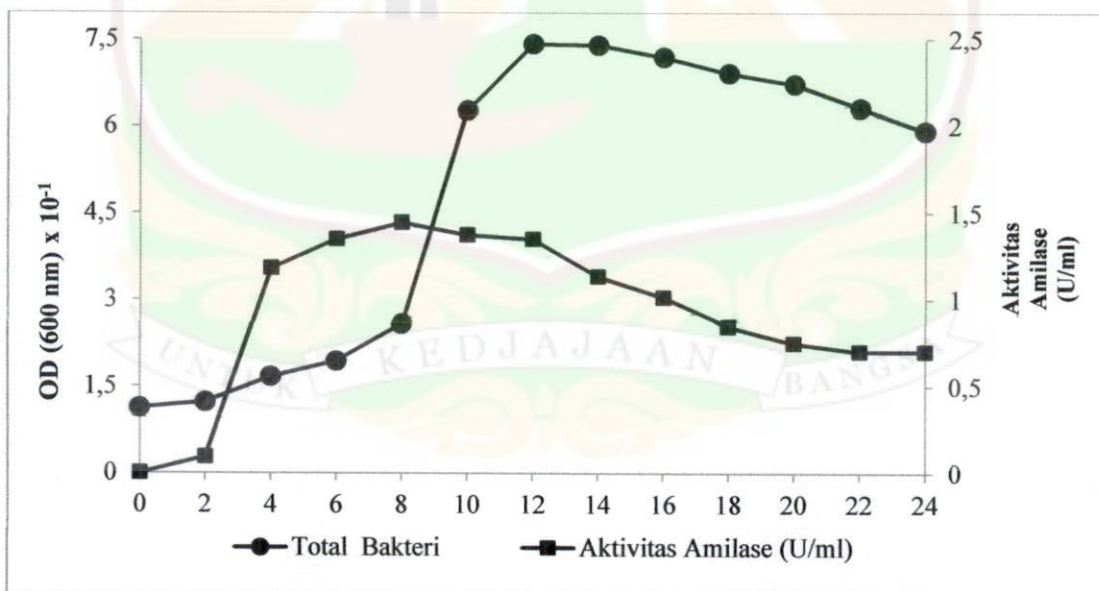
Seperti halnya suhu, Gambar 5 menunjukkan bahwa produksi amilase mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan nilai pH dan setelah tercapai pH optimum laju katalitik enzim mengalami penurunan. Berdasarkan Gambar 5 isolat bakteri TPT-20 menghasilkan amilase pada rentang pH 7 – 9. Laju reaksi optimum pada pH 8 dan mengalami penurunan pada pH diatas 8. Alamri (2010) melaporkan

bahwa produksi amilase dari *Bacillus* sp. pada pH 8 menunjukkan aktivitas yang paling tinggi.

Menurut Lehninger (1982) pH sangat mempengaruhi reaksi enzimatik dimana perubahan pH berakibat langsung terhadap gugus-gugus ionik enzim, sehingga mempengaruhi aktif enzim dan konformasi enzim. Pada pH yang tinggi enzim akan terionisasi dengan kehilangan muatan positifnya. Selain itu perubahan pH terlalu besar diatas pH optimum menyebabkan denaturasi enzim. Winarno (1995) menyatakan bahwa enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran yang disebut pH optimum yang umumnya antara pH 4,5 – 8.

4.5. Kurva Pertumbuhan dan Kurva Aktivitas Amilase Setelah Optimasi

Kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas amilase dari isolat bakteri TPT-20 setelah optimasi disajikan pada Gambar 6.

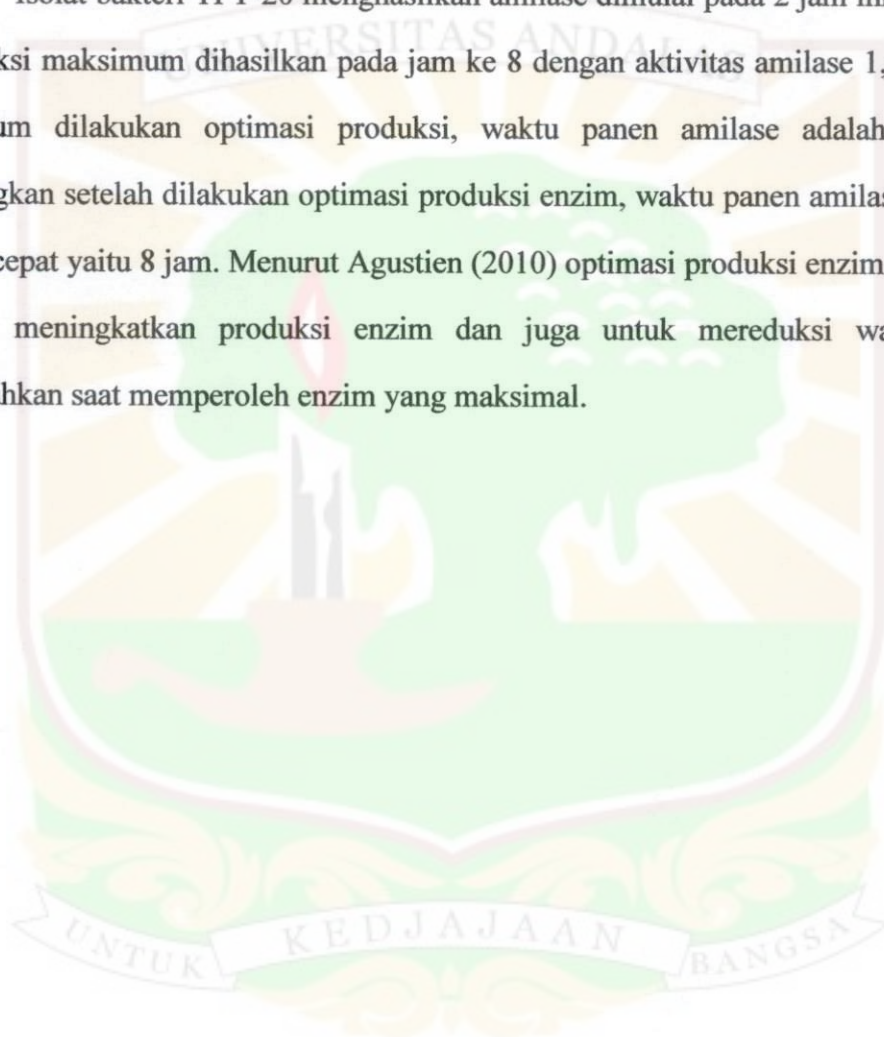


Gambar 6. Kurva pertumbuhan isolat bakteri TPT-20 dan aktivitas amilase setelah optimasi

Setelah dilakukan optimasi untuk memproduksi amilase, profil kurva pertumbuhan isolat bakteri TPT-20 dan aktivitas amilase menunjukkan perbedaan

bila dibandingkan dengan sebelum optimasi. Setelah optimase fase lag hanya berlangsung selama ± 2 jam sedangkan fase eksponensial berlangsung dari jam ke 4 – 10 inkubasi. Fase stasioner berlangsung selama 2 jam yaitu dari jam ke 12 – 14 inkubasi. Selain itu populasi tertinggi diperoleh pada jam ke 12.

Isolat bakteri TPT-20 menghasilkan amilase dimulai pada 2 jam inkubasi dan produksi maksimum dihasilkan pada jam ke 8 dengan aktivitas amilase 1,445 U/ml. Sebelum dilakukan optimasi produksi, waktu panen amilase adalah 10 jam, sedangkan setelah dilakukan optimasi produksi enzim, waktu panen amilase menjadi lebih cepat yaitu 8 jam. Menurut Agustien (2010) optimasi produksi enzim dilakukan untuk meningkatkan produksi enzim dan juga untuk mereduksi waktu yang dibutuhkan saat memperoleh enzim yang maksimal.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan tentang Efek Suhu Inkubasi Dan pH Medium Dalam Produksi Amilase Dari Isolat Bakteri TPT 20 Termofilik maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Waktu panen enzim dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik sebelum optimasi 10 jam, setelah optimasi menjadi 8 jam.
2. Suhu inkubasi dan pH medium terbaik dalam produksi amilase dari isolat bakteri TPT 20 termofilik adalah pada suhu 50° C dan pH 8 dengan produksi 5,484 Unit.

5.2. Saran

Disarankan pada penelitian selanjutnya agar dilakukan penelitian tentang optimasi ekstrinsik yang lebih kompleks sehingga produksi amilase semakin dapat ditingkatkan.

DAFTAR PUSTAKA

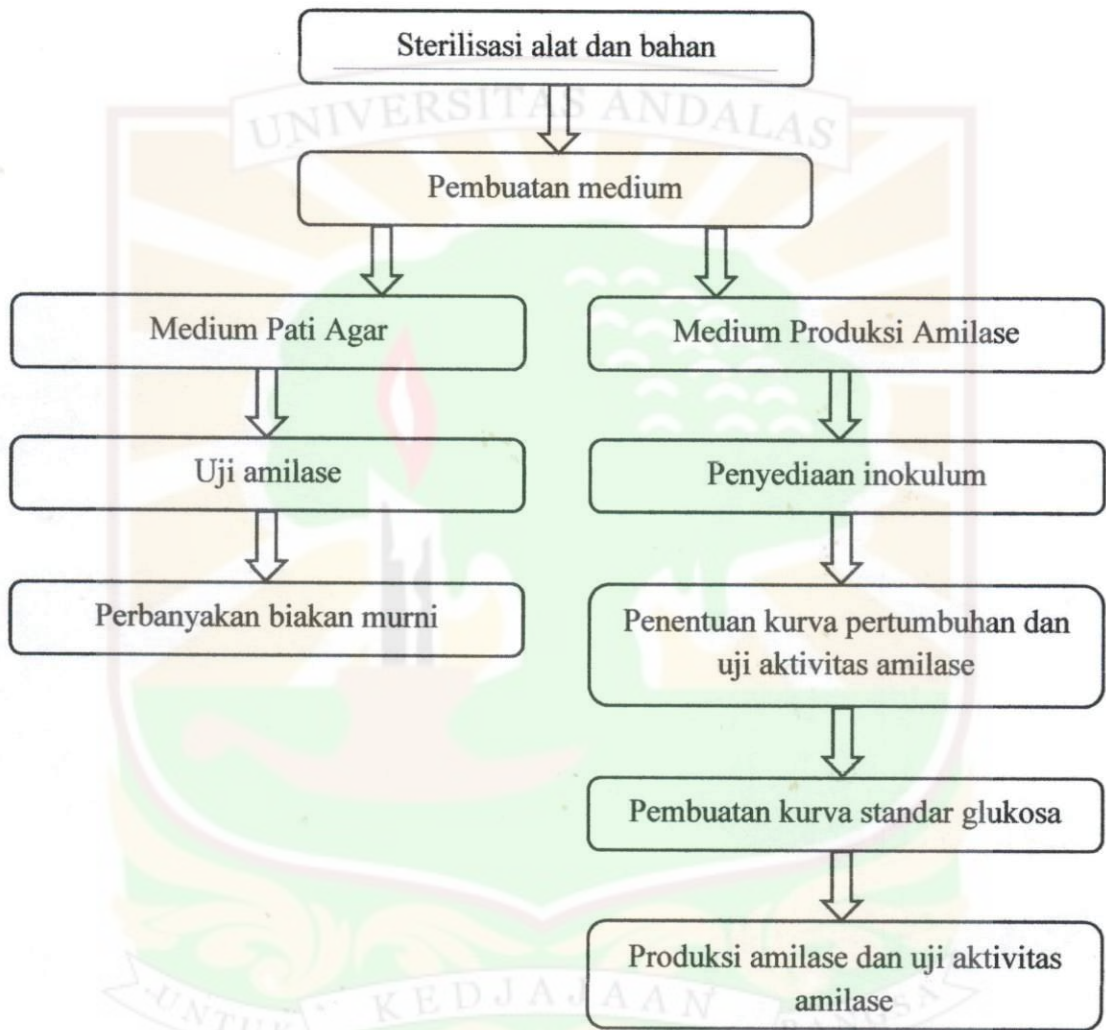
- Anonymous. 2011. *Aktivitas Enzimatik Mikroorganisme*. <http://science-query.com/tag/jumlah-asam-pada/>. 28 Maret 2011.
- Agustien, A. 2005. *Isolasi Dan Karakterisasi Enzim Amilase Termotabil Dari Bakteri Isolat Sumbar*. Project Report. Lembaga Penelitian Universitas Andalas. (Unpublished). <http://repository.unand.ac.id/4699/>. 7 Maret 2011.
- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. Unpad Press. Bandung.
- Alamri, S. A. 2010. Isolation, Phylogeny and Characterization of New α -amylase Producing Thermophilic *Bacillus* sp. from the Jazan Region, Saudi Arabia. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6, 4, 537-547.
- Atlas, R. M. 1997. *Microbiology Fundamentals and Application*. Macmillan Publishing Company. New York.
- Brock T. D. and Brock K. M. 1978. *Basic microbiology with application*. 2nd edition. Prentice Hall, Inc, New Jersey. p.583.
- Brock T. D. 1985. Life at High Temperatures. *Science*, 230, 132-138.
- Brock T. D. 1986. *Thermophiles: General, Molecular*. 2nd Applied Microbiology. A Willey Interscience Publication.
- Carvalho R. V., T. L. R. Correa, J. C. M. Silva, L. R. C. O. Mansur and M. L. L. Martins. 2008. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 102-107.
- Cappucino, J. G. and Sherman, N. 1983. *Microbiology a Laboratory Manual* 4th edition. Addison Wesley Publishing Company. Inc. Menlo Park.
- Crueger, W. And A. Crueger. 1984. *A Text Book of Industrial Microbiology*. Ed. T. D. Brock, Sinaeur Associates Inc New York
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

- Fitri, K. 2011. *Isolasi dan Karakterisasi Parsial Bacillus sp. Termo-alkalifilik Proteolitik Isolat Asal Sumber Air Panas Semurup Jambi*. Skripsi Sarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas. Padang.
- Friedman, S. M. 1992. Thermophilic Microorganism. *Encyclopedia Microbiology*, 4, 217-229.
- Hayati, A. 1998. *Uji Aktivitas Enzim Amilolitik Beberapa Isolat Bakteri dari Sumber Air Panas*. Skripsi Sarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas. Padang.
- Hewitt, J. C. and G. L. Solomons 1996. The Production of α -amilase (E. C. 3. 2. 1. 1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a Complex and a Totally Defined Syntetic Cultural Medium. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 96-99.
- Lay, B. W. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Diterjemahkan oleh Thesnawijaya, M. Erlangga. Jakarta.
- Linko, Y. Y., and X. Y. Wu. 1993. Improvement And Estimation of Enzymatic Starch Saccharification Process. *Iprocess Biotechnology. Techniques*, 7, 8, 551-556.
- Martoharsono, S. 1982. *Biokimia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Nascimento, W. C. A. and M. L. L. Martins. 2004. Production and Properties of An Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 91-96. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v35nl-2/arqvs.pdf>. 7 Maret 2011.
- Palmer, T. 1985. *Understanding Enzyme*. Ellishorwood Publisher.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Diterjemahkan oleh Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, F. M. T. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Edisi Revisi. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.

- Riaz, N., I. U. Haq and M. A. Qadeer. 2003. Characterization of α -Amylase by *Bacillus subtilis*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 5, 3, 249-252.
- Reddy, N. S., A. Nimmagadda and K. R. S. S. Rao. 2003. An overview of thermicrobial α -Amylase family. *African Journal of Biotechnology*, 2, 645-648.
- Saboto, D., R. Nucci, M. Rossi, I. Gryczynski, Z. Gryczynski and J. Lakowicz. 1999. The β -glucosidase from The Hyperthermophilic Archaeon *sulfolobusolfataricus* : Enzyme Activity and Conformational Dynamic at Temperature Above 100⁰C. *Biophysic. Chemistry*, 81, 23-31.
- Schlegel, H. G. dan K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Edisi Keenam. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Suriawiria, U. 1980. *Mikrobiologi Umum*. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam ITB. Bandung.
- Sutiamiharja, N. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Kasar Termofilik Dari Sumber Air Panas Gurukinayan Karo Sumatera Utara*. Tesis Sekolah Pasca Sarjana Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Teodoro, C. E. S. and M. L. L. Martins. 2000. Culture Conditions for The Production of Thermostable Amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 298-302.
- Vidyalakshmi, R, R. Paranthaman and J. Indhumathi. 2009. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry*, 4, 1, 89-91.
- Volk dan Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi Kelima Jilid 1. Erlangga. Jakarta.
- Waluyo, L. 2007. *Mikrobiologi Umum Edisi Revisi*. Penerbitan Universitas Muhammadiyah. Malang.
- Winarno, F. G. 1995. *Enzim Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja



Lampiran 2. Penyediaan Reagen

A. Reagen Somogy-Nelson

Dibuat dengan mencampurkan 25 bagian reagen Somogy-Nelson A dan 1 bagian reagen Somogy-Nelson B.

Reagen Somogy-Nelson A :

Dilarutkan 2,5 gram Natrium Karbonat, 2,5 gram Kalium Natrium Tartarat, 2 gram Natrium Bikarbonat, dan 20 gram Natrium Sulfat dalam 100 ml aquadest.

Reagen Somogy-Nelson B :

Dilarutkan 7,5 gram Tembaga Sulfat Hidrat dalam 50 ml aquadest, lalu ditambahkan 1 tetes Asam Sulfat pekat.

B. Reagen Arsenomolibdat

Dibuat dengan cara melarutkan 2,5 gram ammonium molibdat dalam 45 ml aquadest. Ditambahkan 2,5 ml asam sulfat dan dihomogenkan. Kemudian tambahkan 0,3 gram disodium hidrogen arsenat yang telah dilarutkan dalam 25 ml aquadest. Dihomogenkan dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam.

C. Larutan Buffer Posfat

Larutan A : 0,68 gram KH_2PO_4 dilarutkan dalam 100 ml aquadest

Larutan B : 0,87 gram K_2HPO_4 dilarutkan dalam 100 ml aquadest

Sebanyak 87,7 ml larutan A ditambahkan dengan 12,3 ml larutan B, kemudian volumenya dicukupkan menjadi 200 ml dengan penambahan aquadest.

D. Pembuatan Larutan Pati 1 %

Dibuat dengan melarutkan 1 gram pati dalam 2,5 ml aquadest yang telah dididihkan lalu dihomogenkan, selanjutnya ditambahkan 45 ml aquadest yang telah dididihkan. Setelah itu ditambah 2,5 ml buffer posfat pH 6 dan dicukupkan sampai volumenya 100 ml dengan aquadest dan dihomogenkan.

Lampiran 3. Penentuan Kurva Standar Glukosa

Data absorban standar glukosa ($\lambda = 600 \text{ nm}$)

No.	Konsentrasi Glukosa ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi
1.	0	0
2.	20	0,047
3.	40	0,292
4.	60	0,492
5.	80	0,930
6.	100	1,380

Penentuan Persamaan Garis Regresi Larutan standar Glukosa

No.	X	Y	XY	X ²
1.	0	0	0	0
2.	20	0,047	0,94	400
3.	40	0,292	11,68	1600
4.	60	0,492	29,52	3600
5.	80	0,930	74,4	6400
6.	100	1,380	138	10000
Σ	300	3,141	254,54	22000

Dimana : X = Konsentrasi glukosa

Y = Absorbansi

Persamaan garis regresi : $Y = a + bX$

$$\begin{aligned}
 b &= \frac{\sum XY - (\sum y)(\sum X) / n}{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n} \\
 &= \frac{254,54 - ((3,141)(300)/6)}{22.000 - (300^2 / 6)} \\
 &= \frac{254,54 - 157,05}{22.000 - 15.000} \\
 &= \frac{97,49}{7000} \\
 &= 0,0139271 \approx 0,0139
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 a &= Y \text{ rata-rata} - bX \text{ rata-rata} \\
 &= 0,5235 - 0,0139271 (50) \\
 &= 0,5235 - 0,696355 \\
 &= -0,172855 \approx 0,1729
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y &= a + bX \\
 &= -0,1729 + 0,0139X
 \end{aligned}$$

Penentuan koefisien korelasi (R^2)

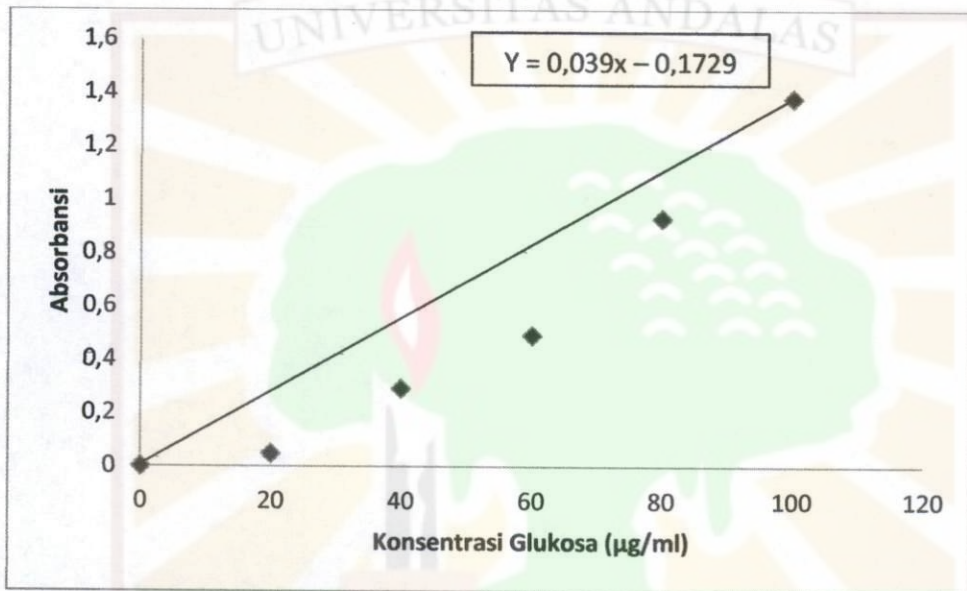
No.	X_i	Y_i	$Y_i - Y_{rata}$	$(Y_i - Y_{rata})^2$	$Y_r = a + bX_i$	$Y_r - Y_{rata}$	$(Y_r - Y_{rata})^2$
1.	0	0	-0,5235	0,27405225	-0,1729	-0,6964	0,48497296
2.	20	0,047	-0,4765	0,22705225	0,1051	-0,4184	0,17505856
3.	40	0,292	-0,2315	0,05359225	0,3831	-0,1404	0,01971216
4.	60	0,492	-0,0315	0,00099225	0,6611	0,1376	0,01893376
5.	80	0,930	0,4065	0,16524225	0,9391	0,4156	0,17272336
6.	100	1,380	0,8565	0,73359225	1,2171	0,6936	0,48108096
	50	0,5235	0	0,24242058	0,5221	-0,0014	0,22541363

Dari tabel diatas terlihat bahwa $R^2 = JKR / JKT$

$$= 0,22541363 / 0,24242058$$

$$= 0,93$$

Kurva Standar Glukosa



Lampiran 4. Penentuan Aktivitas dan Produksi Enzim Amilase

Contoh perhitungan aktivitas enzim

1 ml enzim + 1 ml substrat diperoleh absorbansi 2,27

Persamaan Regresi Kurva Standar Glukosa :

$$Y = -0,1729 + 0,0139X$$

$$2,27 = -0,1729 + 0,0139X$$

$$0,0139X = 2,27 + 0,1729$$

$$0,0139X = 2,4429$$

$$X = \frac{2,4429}{0,01329}$$

$$X = 175,748 \mu\text{g/ml}$$

Reaksi enzim terjadi selama 30 menit maka,

$$\text{aktivitas enzim} = \frac{175,748 \mu\text{g/ml}}{30 \text{ menit}} = 5,858 \text{ U/ml}$$

Contoh Perhitungan Produksi Enzim

$$\text{Aktivitas Enzim} = 5,858 \text{ U/ml}$$

$$\text{Volume supernatan} = 0,94 \text{ ml}$$

$$\text{Produksi amilase} = \text{Aktivitas enzim} \times \text{Volume supernatan}$$

$$= 5,858 \text{ U/ml} \times 0,94 \text{ ml}$$

$$= 5,507 \text{ Unit}$$

Lampiran 5. Analisis Statistik Efek Suhu Inkubasi dan pH Medium Terhadap Produksi Amilase

	B1	B2	B3	B4	B5	Total
A1	0,399	0,426	0,429	0,421	0,407	
	0,394	0,426	0,425	0,421	0,399	
Total	0,793	0,852	0,854	0,842	0,806	4,147
Rata-rata	0,3965	0,426	0,427	0,421	0,403	
A2	1,628	3,598	5,507	0,923	0,416	
	1,619	3,561	5,461	0,955	0,412	
Total	3,247	7,159	10,968	1,878	0,828	24,08
Rata-rata	1,6235	3,5795	5,484	0,939	0,414	
A3	0,728	1,064	1,043	1,791	1,621	
	0,704	1,053	1,055	1,709	1,582	
Total	1,432	2,117	2,098	3,5	3,203	12,35
Rata-rata	0,716	1,0585	1,049	1,75	1,6015	
A4	0,433	0,399	0,449	0,429	0,421	
	0,429	0,403	0,44	0,433	0,421	
Total	0,862	0,802	0,889	0,862	0,842	4,257
Rata-rata	0,431	0,401	0,4445	0,431	0,421	
Total	6,334	10,93	14,809	7,082	5,679	44,834

Lampiran 6. Analisis Statistik Efek Suhu Inkubasi dan pH Medium Terhadap Produksi Amilase Setelah Ditransformasikan Dengan $x + 1$

	B1	B2	B3	B4	B5	Total
A1	1,399	1,426	1,429	1,421	1,407	
	1,394	1,426	1,425	1,421	1,399	
Total	2,793	2,852	2,854	2,842	2,806	14,147
Rata-rata	1,3965	1,426	1,427	1,421	1,403	
A2	2,628	4,598	6,507	1,923	1,416	
	2,619	4,561	6,461	1,955	1,412	
Total	5,247	9,159	12,968	3,878	2,828	34,08
Rata-rata	2,6235	4,5795	6,484	1,939	1,414	
A3	1,728	2,064	2,043	2,791	2,621	
	1,704	2,053	2,055	2,709	2,582	
Total	3,432	4,117	4,098	5,5	5,203	22,35
Rata-rata	1,716	2,0585	2,049	2,75	2,6015	
A4	1,433	1,399	1,449	1,429	1,421	
	1,429	1,403	1,44	1,433	1,421	
Total	2,862	2,802	2,889	2,862	2,842	14,257
Rata-rata	1,431	1,401	1,4445	1,431	1,421	
Total	14,334	18,93	22,809	15,082	13,679	84,834

Analisis sidik ragam

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor Korelasi (FK)} &= \frac{(\sum (y_{ij}))^2}{r.a.b} \\
 &= \frac{(84,834)^2}{2.4.5} \\
 &= \frac{7196,808}{40} \\
 &= 179,920
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} &= \sum (y_{ij})^2 - \text{FK} \\
 &= (1,399)^2 + (1,394)^2 + \dots + (1,421)^2 - 179,920 \\
 &= 243,084 - 179,920 \\
 &= 63,164
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Derajat bebas (db)} &= t.r - 1 \\
 &= 20.2 - 1 \\
 &= 39
 \end{aligned}$$

Perlakuan

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah Kuadrat (JKP)} &= \frac{\sum (y_{ij})^2}{r} - FK \\
 &= \frac{(2,793)^2 + (2,852)^2 + \dots + (2,842)^2}{2} - 179,920 \\
 &= 243,077 - 179,920 \\
 &= 63,157
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Derajat bebas (db)} &= t - 1 \\
 &= 20 - 1 \\
 &= 19
 \end{aligned}$$

$$\text{Kuadrat total (KTP)} = \text{JKP/db} = 63,157/19 = 3,240$$

Perlakuan A

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah Kuadrat A (JKA)} &= \frac{\sum (y_{ij})^2}{r \cdot t_b} - FK \\
 &= \frac{(14,147)^2 + (34,08)^2 + (22,35)^2 + (14,257)^2}{2.5} - 179,920 \\
 &= 2064,37/10 - 179,920 \\
 &= 206,437 - 179,920 \\
 &= 26,517
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Derajat bebas (db)} &= t_a - 1 \\
 &= 4 - 1 \\
 &= 3
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kuadrat total (KTA)} &= \text{JKA/db} \\
 &= 26,517/3 \\
 &= 8,839
 \end{aligned}$$

Perlakuan B

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah kuadrat B (JKB)} &= \frac{\sum (y_{ij})^2}{r \cdot t_a} - FK \\
 &= \frac{(14,334)^2 + (18,93)^2 + \dots + (13,679)^2}{2.4} - FK \\
 &= 1498,640/8 - 179,920 \\
 &= 187,33 - 179,920 \\
 &= 7,41
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Derajat bebas (db)} &= t_b - 1 \\
 &= 5 - 1 \\
 &= 4
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat total (KTB)} &= \text{JKB/Db} \\ &= 7,41/4 \\ &= 1,853 \end{aligned}$$

Interaksi

$$\begin{aligned} \text{Jumlah kuadrat (JKI)} &= \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB} \\ &= 63,157 - 26,517 - 7,41 \\ &= 29,23 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Derajat bebas (db)} &= (ta-1) (tb-1) \\ &= (4-1) (5-1) \\ &= (3) (4) \\ &= 12 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat total (KTI)} &= \text{JKI/Db} \\ &= 29,23/12 \\ &= 2,436 \end{aligned}$$

Galat

$$\begin{aligned} \text{Jumlah kuadrat (JKG)} &= \text{JKtotal} - \text{JK perlakuan} \\ &= 63,164 - 63,157 \\ &= 0,007 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Derajat bebas (db)} &= t(r-1) \\ &= 20 (2-1) \\ &= 20 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat total (KTG)} &= \text{JK/Db} \\ &= 0,007/ 20 \\ &= 0,00035 \end{aligned}$$

Fhitung

$$\begin{aligned} \text{Perlakuan} \quad F &= \frac{\text{KT perlakuan (KTP)}}{\text{KT Galat (KTG)}} \\ &= 3,240/0,00035 \\ &= 9257,143 \end{aligned}$$

Perlakuan Suhu Inkubasi (A)

$$\begin{aligned} F &= \frac{\text{KT perlakuan A(KTA)}}{\text{KT Galat (KTG)}} \\ &= 8,839/ 0,00035 \\ &= 25254,286 \end{aligned}$$

Perlakuan pH medium(B)

$$F = \frac{\text{KT perlakuan B (KTB)}}{\text{KT Galat (KTG)}}$$

$$= 1,853/0,00035$$

$$= 5294,286$$

Interaksi

$$F = \frac{KT \text{ interaksi (KTI)}}{KT \text{ Galat (KTG)}}$$

$$= 2,436/ 0,00035$$

$$= 6960$$

Daftar Analisis sidik ragam efek suhu inkubasi dan pH medium terhadap produksi amilase

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	Fhitung	Ftabel taraf 5 %
Perlakuan	19	63,157	3,24	9257,143*	2,15
Perlakuan A	3	26,517	8,839	25254,286*	3,10
Perlakuan B	4	7,41	1,853	5294,286*	2,67
Interaksi AB	12	29,23	2,436	6960*	2,28
Galat	20	0,007	0,00035		
Total	39	63,164			

Keterangan : * = berbeda nyata antar perlakuan pada taraf 5 %, F hit > F tabel, maka dilakukan uji lanjut

Uji Lanjut Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) Efek Suhu Inkubasi dan pH Medium Terhadap Produksi Amilase Pada Taraf 5%
Rata-rata Produksi Amilase (Unit)

	B1	B2	B3	B4	B5	Total	Rata-rata
A1	1,3965	1,426	1,427	1,421	1,403	7,0735	1,4147
A2	2,6235	4,5795	6,484	1,939	1,414	17,04	3,408
A3	1,716	2,0585	2,049	2,75	2,6015	11,175	2,235
A4	1,431	1,401	1,4445	1,431	1,421	7,1285	1,4257
Total	7,167	9,465	11,4045	7,541	6,8395		
Rata-rata	1,79175	2,36625	2,851125	1,88525	1,709875		

Rumus LSR = $S_x \times SSR$

Faktor A = suhu inkubasi

$$S_x A = \sqrt{\frac{KT \text{ galat}}{r.ta}} = \sqrt{\frac{0,00035}{2.5}} = 0,00592$$

Daftar SSR dan LSR 5 % untuk Faktor A

SSR 20	2	3	4
	2,95	3,1	3,18
LSR 5 % = $SX \times SSR 5 \%$	0,017464	0,018352	0,018826

Daftar uji lanjut Duncan's terhadap faktor A

Perlakuan	Rata-rata	A2	A3	A4	A1	LSR 5%	Notasi
A2	2,408	-				-	A
A3	2,235	0,173*	-			0,0175	B
A4	1,426	0,982*	0,809*	-		0,0183	C
A1	1,415	0,993*	0,820*	0,011 ^{ns}	-	0,0188	C

Keterangan : * = berbeda nyata antar perlakuan pada taraf 5 %

^{ns} = tidak berbeda nyata antar perlakuan

Faktor B = pH medium

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ galat}}{r.ta}} = \sqrt{\frac{0,00035}{2.4}} = 0,00661$$

Daftar SSR dan LSR 5 % untuk faktor B (pH medium)

SSR 20	2	3	4	5
	2,95	3,1	3,18	3,25
LSR 5 % = $SX \times SSR 5 \%$	0,0195	0,020491	0,02102	0,021483

Daftar uji lanjut Duncan's terhadap faktor B

Perlakuan	Rata-rata	B3	B2	B4	B1	B5	LSR 5%	Notasi
B3	2,851	-					-	A
B2	2,366	0,485*	-				0,0195	B
B4	1,885	0,966*	0,481*	-			0,0205	C
B1	1,792	1,059*	0,574*	0,093*	-		0,0210	D
B5	1,710	1,141*	0,656*	1,175*	0,082*		0,0215	E

Keterangan : * = berbeda nyata antar perlakuan pada taraf 5 %

Faktor AB

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ galat}}{r.ta.tb}} = \sqrt{\frac{0,00035}{2.4.5}} = 0,00296$$

Daftar SSR dan LSR 5 % untuk faktor AB (suhu inkubasi dan pH medium)

SSR 20	2	3	4	5	6	7	8
	2,95	3,1	3,18	3,25	3,3	3,34	3,36
LSR 5 % = SX x							
SSR 5 %	0,0087	0,0092	0,0094	0,0096	0,0098	0,0099	0,01
SSR 20	9	10	11	12	13	14	
	3,38	3,4	3,42	3,43	3,44	3,44	
LSR 5 % = SX x							
SSR 5 %	0,01	0,01	0,0101	0,0102	0,0102	0,0102	
SSR 20	15	16	17	18	19	20	
	3,45	3,46	3,46	3,46	3,47	3,47	
LSR 5 % = SX x							
SSR 5 %	0,0102	0,0102	0,0102	0,0102	0,0103	0,0103	

Daftar uji lanjut Duncan's terhadap faktor AB

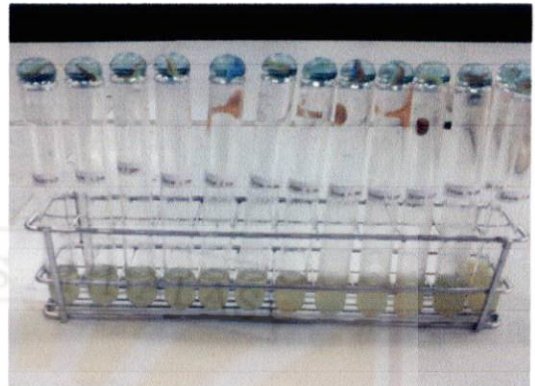
Perlakuan	Rata-rata	A2B3	A2B2	A3B4	A2B1	A3B5	A3B2	A3B3	A2B4	A3B1	A4B3	A4B1	A4B4	A1B3	A1B2	A1B4	A4B5	A2B5	A1B5	A4B2	A1B1	LSR 5 %	Notasi
A2B3	6,848	-																				-	a
A2B2	4,58	2,268*	-																			0,0087	b
A3B4	2,75	4,098*	1,83*	-																		0,0092	c
A2B1	2,624	4,224*	1,956*	0,126*	-																	0,0094	d
A3B5	2,602	4,246*	1,978*	0,148*	0,022*	-																0,0096	e
A3B2	2,059	4,789*	2,521*	0,691*	0,565*	0,543*	-															0,0098	f
A3B3	2,049	4,799*	2,531*	0,701*	0,575*	0,553*	0,01 ^{ns}	-														0,0099	f
A2B4	1,939	4,909*	2,641*	0,811*	0,685*	0,663*	0,12*	0,11*	-													0,01	g
A3B1	1,716	5,132*	2,864*	1,034*	0,908*	0,886*	0,343*	0,333*	0,223*	-												0,01	h
A4B3	1,445	5,403*	3,135*	1,305*	1,179*	1,157*	0,614*	0,604*	0,494*	0,271*	-											0,01	i
A4B1	1,431	5,417*	3,149*	1,319*	1,193*	1,171*	0,628*	0,618*	0,508*	0,285*	0,014*	-										0,0101	j
A4B4	1,431	5,417*	3,149*	1,319*	1,193*	1,171*	0,628*	0,618*	0,508*	0,285*	0,014*	0 ^{ns}	-									0,0102	j
A1B3	1,427	5,421*	3,153*	1,323*	1,197*	1,175*	0,632*	0,622*	0,512*	0,289*	0,018*	0,004 ^{ns}	0,004 ^{ns}	-								0,0102	j
A1B2	1,426	5,422*	3,154*	1,324*	1,198*	1,176*	0,633*	0,623*	0,513*	0,29*	0,019*	0,005 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0,001 ^{ns}	-							0,0102	j
A1B4	1,421	5,427*	3,159*	1,329*	1,203*	1,181*	0,638*	0,628*	0,518*	0,295*	0,024*	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,006 ^{ns}	0,005 ^{ns}	-						0,0102	jk
A4B5	1,421	5,427*	3,159*	1,329*	1,203*	1,181*	0,638*	0,628*	0,518*	0,295*	0,024*	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,006 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0 ^{ns}	-					0,0102	jk
A2B5	1,414	5,434*	3,166*	1,336*	1,21*	1,188*	0,645*	0,635*	0,525*	0,302*	0,031*	0,017*	0,017*	0,013*	0,012*	0,007 ^{ns}	0,007 ^{ns}	-				0,0102	k
A1B5	1,403	5,445*	3,177*	1,347*	1,221*	1,199*	0,656*	0,646*	0,536*	0,313*	0,042*	0,028*	0,028*	0,024*	0,023*	0,018*	0,018*	0,011*	-			0,0102	l
A4B2	1,401	5,447*	3,179*	1,349*	1,223*	1,201*	0,658*	0,648*	0,538*	0,315*	0,044*	0,03*	0,03*	0,026*	0,025*	0,02*	0,02*	0,013*	0,002 ^{ns}	-		0,0103	l
A1B1	1,367	5,481*	3,213*	1,383*	1,257*	1,235*	0,692*	0,682*	0,572*	0,349*	0,078*	0,064*	0,064*	0,06*	0,059*	0,054*	0,054*	0,047*	0,036*	0,034*	-	0,0103	m

Keterangan : * = berbeda nyata antar perlakuan pada taraf 5 %
^{ns} = tidak berbeda nyata antar perlakuan

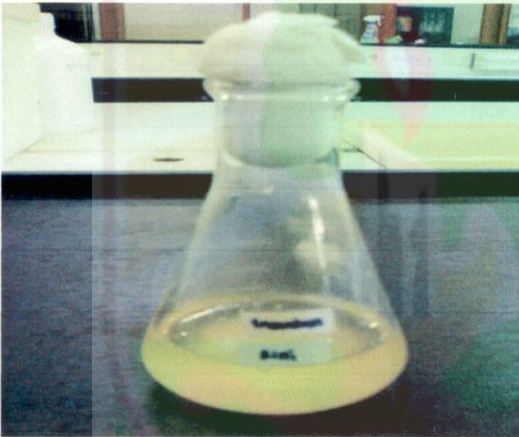
Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



Gambar 7. Biakan Murni



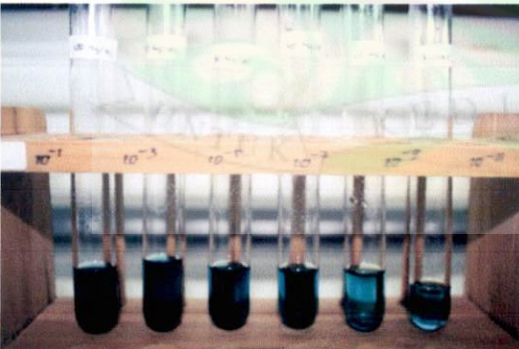
Gambar 8. Sampel pertumbuhan bakteri



Gambar 9. Inokulum



Gambar 10. Pengukuran pertumbuhan



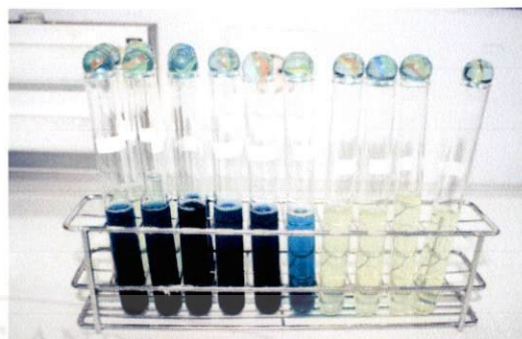
Gambar 11. Sampel kurva standar glukosa



Gambar 12. Larutan Kasar enzim



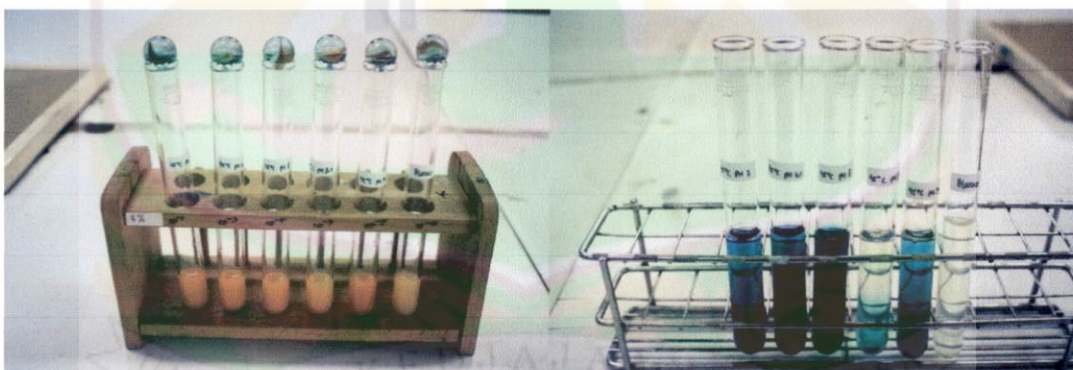
Gambar 13. Enzim setelah dipanaskan



Gambar 14. Enzim setelah ditambah reagen arsenomolibdat



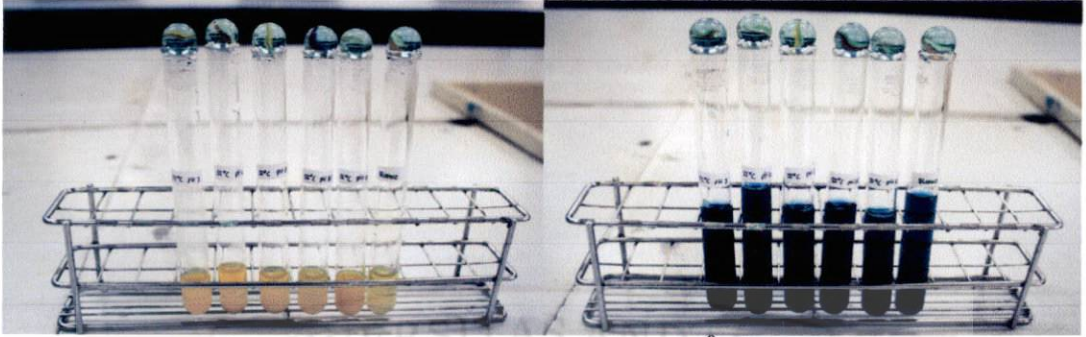
Gambar 15. Pengukuran aktivitas enzim



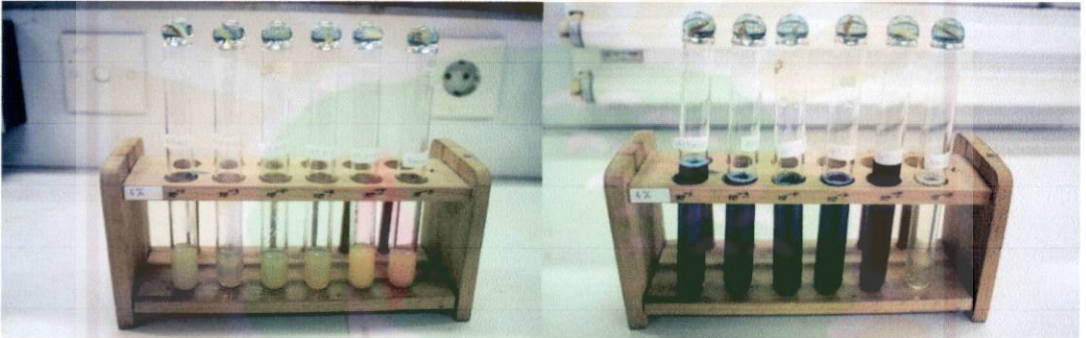
Gambar 16. Produksi Enzim pada suhu 45⁰ C dan pH 7 – 9



Gambar 17. Produksi Enzim pada suhu 50⁰ C dan pH 7 – 9



Gambar 18. Produksi Enzim pada suhu 55°C dan pH 7 – 9



Gambar 19. Produksi Enzim pada suhu 60°C dan pH 7 – 9



BIODATA

Nama : Desriningsih
 Tempat dan Tanggal Lahir : Pekanbaru / 13 Desember 1988
 Agama : Islam
 Golongan Darah : A
 Alamat : Jl. Mawar Blok CI No. 27 KPR Tebing Indah Permai,
 Tebing Tinggi, Tanjung Jabung Barat, Jambi.
 Motto Hidup : Lakukan Apa Yang Bisa Dilakukan Hari Ini
 Nama Orang Tua :
 Ayah : Naharuddin
 Ibu : Yukasmimi
 Latar Belakang Pendidikan :
 SD : SD YPMM (1995 – 2001)
 SMP : SMP YPMM (2001 – 2004)
 SMA : SMA Titian Teras Jambi (2004 – 2007)
 Universitas : S1 Biologi FMIPA UNAND (2007 – 2011)
 Pengalaman Organisasi :
 1. Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMABIO) UNAND
 2. Ikatan Alumni Titian Teras (IATT)
 3. Ikatan Mahasiswa Keluarga Jambi (IMKJ)
 Prestasi :
 1. Anggota Penerima Hibah PKMP Dikti 2009
 2. Anggota Penerima Hibah PKMP Dikti 2011
 3. Asisten Mikrobiologi 2010 dan 2011