



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.

**OPTIMASI EKSTRINSIK PARSIAL BAKTERI  
PROTEOTERMOFOLIK ASAL SUMBER AIR PANAS SUNGAI  
MEDANG, KABUPATEN KERINCI, JAMBI**

**TESIS**



**NASRAZUHDY  
1021208023**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG 2013**

# **Optimasi Ekstrinsik Parsial Bakteri Proteotermofilik Sumber Air Panas Sungai Medang Kabupaten Kerinci, Jambi**

Oleh : Nasrazuhdy

(Di bawah bimbingan Anthoni Agustien dan Periadnadi)

## **RINGKASAN**

Bakteri termofilik mampu hidup pada suhu tinggi disebabkan enzim-enzim dan protein yang hampir semuanya stabil terhadap panas dan tahan denaturasi sehingga mampu beradaptasi terhadap kondisi lingkungan ekstrim untuk hidup dan bertahan hidup dibandingkan bakteri yang bersifat mesofilik. Dewasa ini, Isolasi bakteri termofilik dari beberapa habitat telah dilakukan dengan tujuan penggunaan bakteri dan enzim yang dihasilkannya untuk diterapkan dalam bidang bioteknologi secara intensif. Mikroorganisme termofilik merupakan mikroorganisme yang tumbuh pada suhu optimum di atas 45°C. Kebanyakan mikroorganisme termofilik memiliki suhu optimum di bawah 80°C, mikroorganisme yang bersifat termofilik berasal dari kelompok archaea dan bakteri.

Protease adalah enzim golongan hidrolase yang berperan dalam reaksi pemecahan ikatan peptida pada molekul protein. Protease banyak digunakan pada beberapa aplikasi industri seperti detergen, farmasi, penyamakan kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, dan proses pengolahan limbah industri. Pada saat ini, enzim yang stabil pada kondisi ekstrim, terutama pada suhu yang tinggi makin dicari khususnya protease yang banyak diminati oleh kalangan industri karena penerapannya yang begitu luas, pada suhu tinggi, resiko kontaminasi berkurang dan laju reaksi berjalan lebih cepat sehingga prosesnya dirasa makin efisien. Selain itu enzim yang tahan panas pada suhu tinggi telah menjadi pusat perhatian banyak peneliti karena struktur dan sifatnya yang unik produksi Enzim yang diproduksi mempunyai aktivitas yang tinggi sehingga dapat digunakan dalam aplikasinya, haruslah dilakukan optimasi terhadap mikroorganisme penghasil enzim tersebut. Optimasi ekstrinsik pada mikroorganisme dilakukan dengan merekayasa kondisi optimal bagi pertumbuhan

mikroorganisme . Peningkatan enzim dengan melakukan rekayasa pada komposisi medium, pH medium, suhu, sumber karbon dan nitrogen

Agitasi merupakan faktor yang penting dalam penghasilan enzim, karena agitasi akan berpengaruh terhadap homogenitas nutrisi, kultur dan penyediaan oksigen pada medium. Produksi keratinase dari *Bacillus lichemiformis* KA-08 dengan agitasi 125 rpm memiliki aktivitas spesifik keratinase paling tinggi, yaitu 452 U/mg. Penambahan Agitasi 150 rpm pada produksi keratinase menyebabkan aktivitas keratinase rendah, hal ini disebabkan pada kondisi tersebut pada medium produksi lebih banyak terdapat buai, sehingga bakteri tidak maksimum menghasilkan keratinase, buih yang ditimbulkan pada medium akibat agitasi yang tinggi dapat penurunan produk fermentasi.

Tujuan dari penelitian ini adalah 1). Mengetahui kemampuan bakteri termofilik asal sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci Jambi dalam menghasilkan enzim protease. 2). Mengetahui pengaruh suhu inkubasi, pH medium dan agitasi terhadap produksi protease.

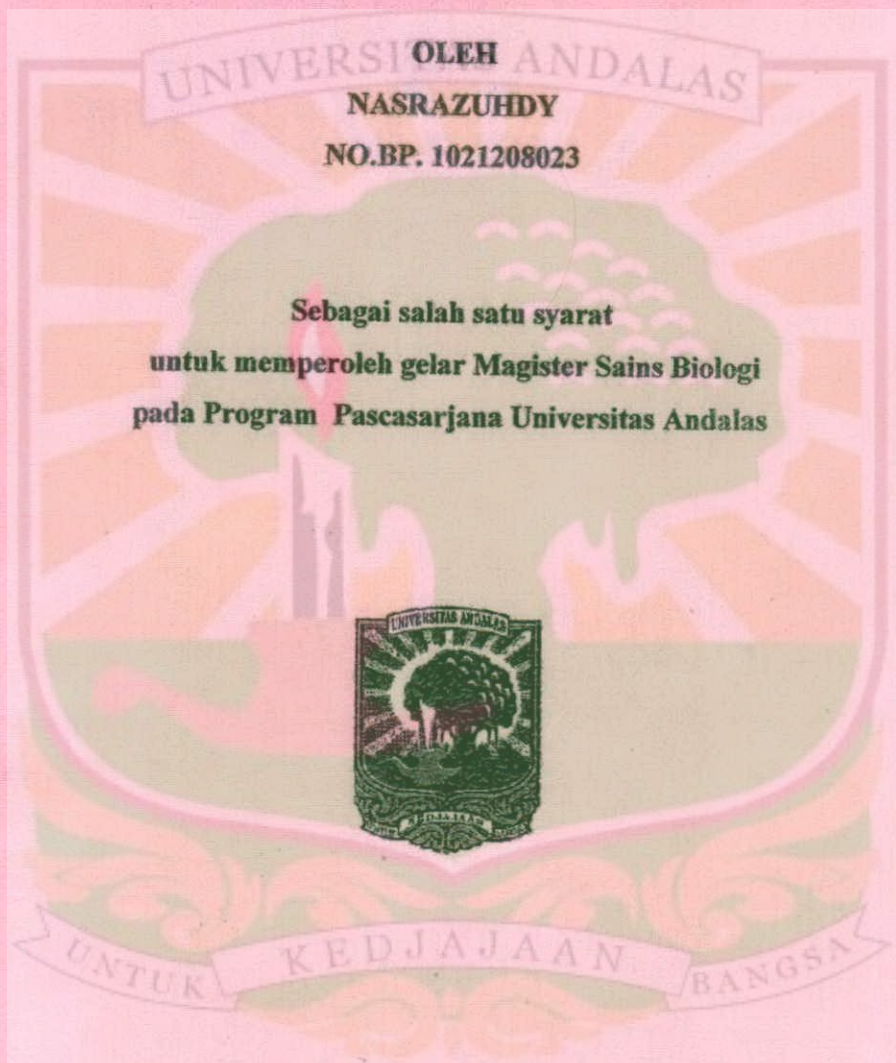
Penelitian telah dilaksanakan dari bulan April 2012 sampai Agustus 2012 di Laboratorium Riset Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas, Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel air panas, cawan petri, timbangan digital, Botol sampel steril, Kertas pH universal, Sentrifuse, Autoclave, Tabung eppendorf, Hot plate, Environmental inkubator, Beker glass, Jarum ose, Mikropipet, spektrofotometer UV-Vis, Haemositometer, Laminar air flow dan freezer.

Metode Penelitian ini dilakukan di lapangan dan laboratorium dengan metode deskriptif dan eksperimental yang terdiri dari tiga tahap 1) Pengambilan sampel di sumber air panas Sungai Medang ,Kabupaten Kerinci Jambi.2) Isolasi dan penapisan bakteri penghasil protease termostabil. 3) Optimasi lingkungan ekstrinsik parsial bakteri penghasil protease termostabil.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan bahwa Sebanyak 70 isolat bakteri termofilik, 39 isolat mengindikasikan bersifat proteolitik. Isolat MI.2.3 memiliki aktifitas spesifik tertinggi (1,87 U/mg) pada kondisi suhu inkubasi 60 °C, pH medium 7,5 dan agitasi 125 rpm.



**OPTIMASI EKSTRINSIK PARSIAL BAKTERI PROTEOTERMOFILIK  
ASAL SUMBER AIR PANAS SUNGAI MEDANG,  
KABUPATEN KERINCI, JAMBI**



**PROGRAM PASCASARJANA FMIPA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG, 2013**



**Judul Penelitian** : **Optimasi Ektrinsik Parsial Bakteri Proteolitik Asal Sumber Air Panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi**

**Nama Mahasiswa** : **Nasrazuhdy**

**Nomor Pokok** : **1021208023**

**Program Studi** : **Biologi**

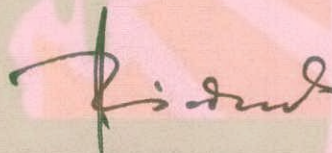
Tesis ini telah diuji dan dipertahankan di depan sidang panitia ujian akhir  
Magister sains pada Program Pascasarjana Universitas Andalas dan dinyatakan  
lulus pada tanggal 28 Januari 2013

Menyetujui

1. Komisi Pembimbing



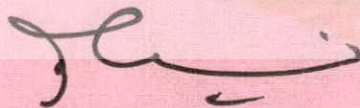
Dr. Anthoni Agustien, MS  
Ketua



Dr. Phil. Nat. Periadnadi  
Anggota

2. Koordinator Pascasarjana

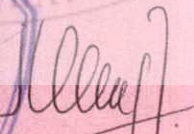
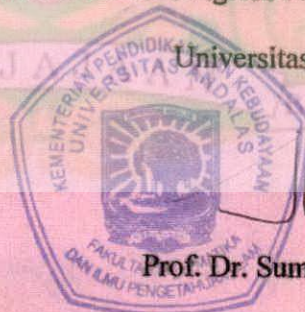
Prodi Biologi



Prof. Dr. Syamsuardi, M.sc

3. Koordinator Program Pascasarjana FMIPA

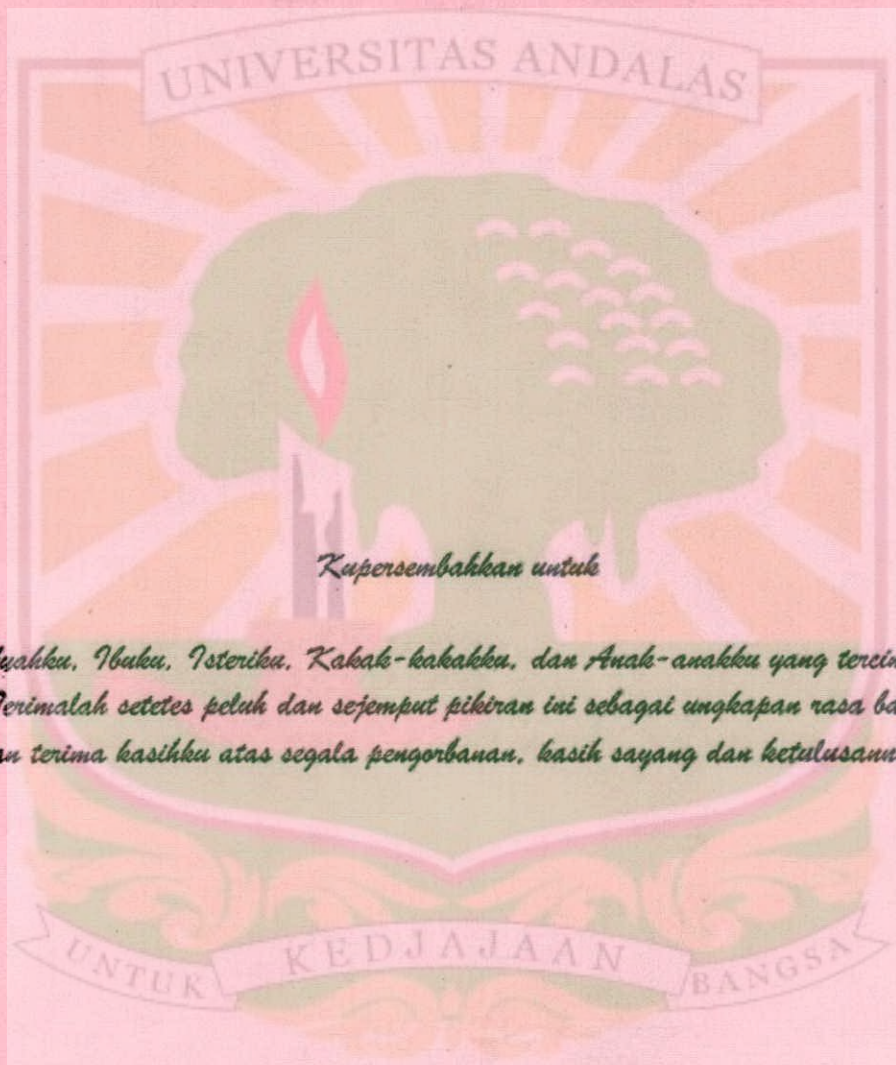
Universitas Andalas



Prof. Dr. Sumaryati Syukur



*Maha suci Engkau ya Allah, sesungguhnya aku tidak mengetahui selain dari pada apa yang telah Engkau ajarkan. Sesungguhnya Engkau Maha mengetahui lagi Maha bijaksana (Al-Baqarah ayat 32)*



*Ayahku, Ibuku, Istriku, Kakak-kakaku, dan Anak-anaku yang tercinta. Terimalah setetes peluh dan sejempit pikiran ini sebagai ungkapan rasa bakti dan terima kasihku atas segala pengorbanan, kasih sayang dan ketulusannya.*

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 06 Juli 1963 di Pulau Tengah Kerinci , Jambi, sebagai anak terakhir dari ayah H. Harun Alrasyid (Almarhum) dan ibu Hj. Hasanah (Almarhumah). Penulis menamatkan SDN 02 Pulau Tengah pada tahun 1974, SMPN Pulau Tengah pada tahun 1977, dan SMAN1 Bengkulu pada tahun 1981. Penulis memperoleh gelar sarjana Biologi pada tahun 1989 di program studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang. Pada tahun 2010 penulis berkesempatan untuk melanjutkan pendidikan jenjang S2 pada Program Pascasarjana Universitas Andalas di Padang.



## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi tesis yang saya tulis dengan judul “*Optimasi Ekstrinsik Parsial Bakteri Proteotermofilik Asal Sumber Air Panas Sungai Medang Kabupaten Kerinci, Jambi*”, adalah hasil kerja/ karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini ternyata tidak benar, maka kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, 28 Januari 2013

Yang membuat pernyataan,

Nasrazuhdy  
1021208023





## **KATA PENGANTAR**

Puji Syukur Penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tesis pada Program Pascasarjana Universitas Andalas. Tesis ini ditulis berpedoman pada hasil penelitian yang telah dilakukan di Laboratorium Riset Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Bapak Dr. Anthoni Agustien, MS dan Bapak Dr. Phil. Nat Periadnadi selaku ketua dan anggota pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penulisan tesis ini.
2. Tim penguji Dr. Nasril Nasir, Dr. Yetria Rilda, MS dan Dr. Phil Nat. Nurmiati, mulai dari seminar proposal, seminar hasil sampai ujian akhir sidang.
3. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.
4. Koordinator Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

5. Ketua Program Pascasarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.
6. Kepala laboratorium Riset Mikrobiologi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang. Yang telah memberikan fasilitas dalam penelitian..
7. Kementerian Kesehatan RI yang telah memberikan beasiswa Studi Pasacasarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang
8. Direktur Poltekkes Jambi yang memberikan izin Studi Pascasarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.
9. Kedua orang tua, ayahanda H. Harun.S. Alrasyd (alm), ibunda Hj. Hasanah (almh) Serta saudara-saudaraku Drs. Asharudin, Dahniar, Spd , Ir. Agustiar, Ir. Zuldiar dan Daswati, Spd.
10. Istriku tercinta Nikmawati dan anak-anakku Prama Natio Adha, Bella Andutina dan Rifqy Putra Zuhdy.

Akhir kata, semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada kita semua. Amin yarabba’alamin.

Padang, 28 Januari 2013

Penulis,

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATAPENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Balakang Masalah.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Habitat mikroorganisme Termofilik.....	6
2.2 Mikroorganisme Termofilik.....	9
2.3 Enzin Protease.....	11
2.4 Enzim Termostabil.....	13
2.5 Optimasi ekstrinsik.....	14
<b>III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan tempat penelitian.....	16
3.2 Bahan dan alat.....	16
3.3 Metode penelitian.....	17
3.3.1 Pengambilan sampel dan pengukuran pH.....	16
3.3.2 Isolasi bakteri proteotermofilik.....	16
3.3.3 Penapisan bakteri proteotermofilik.....	17
3.3.4 Uji aktivitas enzim protease.....	18
3.3.5 Uji kadar protein enzim.....	19
3.3.6 Pengukuran aktivitas spesifik protease.....	20



3.3.7 Profil Kurva Pertumbuhan Bakteri dan	
Kurva aktivitas enzim .....	20
3.3.8 Optimasi ekstrinsik bakteri proteotermofilik .....	21
3.3.8.1 Efek suhu inkubasi.....	21
3.3.8.2 Efek pH medium produksi .....	21
3.3.8.3 Efek agitasi .....	22
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas	
Sungai Medang Kabupaten. Kerinci, Jambi .....	23
4.2 Penapisan bakteri proteotermofilik dari sumber air panas Sungai	
Medang Kabupaten. Kerinci, Jambi.....	25
4.3 Profil kurva pertumbuhan proteotermofilik isolat sungai medang dan	
kurva aktivitas spesifik protease .....	30
4.4 Optimasi ekstrinsik bakteri proteotermofilik .....	35
4.4.1 Efek suhu inkubasi terhadap alktifitas spesifik protease .....	35
4.4.2 Efek pH medium terhadap aktivitas spesifik protease.....	40
4.4.3 Efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease .....	43
4.4.4 Aktivitas protease pada kondisi masing-masing Isolat.....	48
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan .....	50
5.2 Saran.....	50
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>51</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>56</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 1. Isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Sungai Medang Kabupaten Kerinci, Jambi.....	23
Tabel 2. Indek proteolitik masing-masing isolat sumber air panas Sungai Medang Kabupaten Kerinci, Jambi .....	28
Tabel 3. Rata-rata aktivitas spesifik proteoase (U/mg) pada suhu berbeda ..	36
Tabel 4. Rata-rata aktivitas protease (U/mg) pada pH medium berbeda .....	40
Tabel 5. Rata-rata aktivitas spesifik protease (U/mg) pada agitasi berbeda....	44



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tumbuhan hidup dan dedaunan gugur disekitar sumber air panas Sungai medang, Kabupaten. Kerinci, Jambi.....	24
Gambar 2. Aktivitas protease isolat bakteri proteotermofilik pada medium susu skim agar setelah 48 jam inkubasi pada suhu 50 <sup>0</sup> C.....	26
Gambar 3. Profil pertumbuhan isolat MV.1.6 dan aktivitas spesifik protease pada medium NA, dengan pH awal 8,0 dan suhu 50 <sup>0</sup> C.....	31
Gambar 4. Profil pertumbuhan isolat MII.1.18 dan aktivitas spesifik pada pH medium NA dengan pH awal 8,0 dan suhu 50 <sup>0</sup> C .....	31
Gambar 5. Profil pertumbuhan isolat MI.2.3 dan aktivitas spesifik protease pada medium NA, dengan pH awal 8,0 dan suhu 50 <sup>0</sup> C .....	32
Gambar 6. Profil pertumbuhan isolat MII.3.21 dan aktivitas spesifik Protease pada medium NA dengan pH awal 8,0 dan suhu 50 <sup>0</sup> C.....	32
Gambar 7. Profil pertumbuhan isolat MV.1.5 dan aktivitas spesifik pada pH medium NAdengan pH awal 8,0 dan suhu 50 <sup>0</sup> C .....	33
Gambar 8. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.6 .....	36
Gambar 9. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.1.18 .....	37
Gambar 10. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MI.2.3 .....	37
Gambar 11. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.3.21 .....	38
Gambar 12. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.5 .....	38



Gambar 13. Diagram batang efek pH terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.6 .....	40
Gambar 14. Diagram batang efek pH terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.1.18.....	41
Gambar 15. Diagram batang efek pH terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MI.2.3.....	41
Gambar 16. Diagram batang efek pH terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.3.21.....	42
Gambar 17. Diagram batang efek pH terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.5 .....	42
Gambar 18. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.6 .....	45
Gambar 19. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.1.18.....	45
Gambar 20. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MI.2.3.....	46
Gambar 21. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.3.21.....	46
Gambar 22. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.5 .....	47



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
LAMPIRAN1. Komposisi medium yang digunakan dalam penelitian.....	56
LAMPIRAN 2. Pembuatan pereaksi yang digunakan dalam penelitian .....	57
LAMPIRAN 3. Alur kerja isolasi dan penapisan bakteri termo-proteolitik .	58
LAMPIRAN 4. Alur kerja persiapan Inokulum .....	60
LAMPIRAN5. Alur pembuatan profil kurva pertumbuhan bakteri proteotermofilik .....	61
LAMPIRAN 6. Alur kerja isolasi enzim protease .....	62
LAMPIRAN 7. Alur Kerja Uji aktivitas protease.....	63
LAMPIRAN 8. Alur Kerja Uji aktivitas protease.....	64
LAMPIRAN 9. Alur kerja pembuatan kurva standar Tirosin .....	65
LAMPIRAN 10. Alur kerja pembuatan kurva standar BSA .....	66
LAMPIRAN 11. Foto-foto pengamatan sifat fisika air panas Sungai Medang .Kakupaten Kerinci, Jambi.....	67
LAMPIRAN 12. Foto-foto hasil isolasi bakteri termofilik asal sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi .....	68
LAMPIRAN 13. Foto-foto Uji aktivitas enzim protease.....	69
LAMPIRAN 14. Lokasi pengambilan sampel.....	70

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bakteri termofilik mampu hidup pada suhu tinggi disebabkan enzim-enzim dan protein yang hampir semuanya stabil terhadap panas dan tahan denaturasi sehingga mampu beradaptasi terhadap kondisi lingkungan ekstrim untuk hidup dan bertahan hidup dibandingkan bakteri yang bersifat mesofilik. 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 (Madigan, Martinko dan Parker, 2000). Dewasa ini, Isolasi bakteri termofilik dari beberapa habitat telah dilakukan dengan tujuan penggunaan bakteri dan enzim yang dihasilkannya untuk diterapkan dalam bidang bioteknologi secara intensif. (Purwadaria, Suwanto, dan Dirnawan, 2000),

Mikroorganisme termofilik merupakan mikroorganisme yang tumbuh pada suhu optimum di atas 45<sup>0</sup>C. Kebanyakan mikroorganisme termofilik memiliki suhu optimum di bawah 80<sup>0</sup>C, mikroorganisme yang bersifat termofilik berasal dari kelompok archaea dan bakteri (Madigan *et al.*, 2000).

Protease adalah enzim golongan hidrolase yang berperan dalam reaksi pemecahan ikatan peptida pada molekul protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisikokimia dan sifat-sifat katalitik yang sangat bervariasi. Enzim ini dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme, serta mempunyai peranan



yang penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward, *et al.*, 1983). Protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan dan mikroorganisme, Enzim yang berasal dari mikroorganisme mempunyai beberapa kelebihan, di antaranya adalah harganya lebih murah, mutunya lebih seragam, produktivitasnya lebih mudah ditingkatkan, dapat diproduksi dalam jumlah besar, mikroba penghasil enzim dapat ditumbuhkan dengan cepat serta poses isolasi enzim relatif lebih mudah (Winarno, 1986). Protease banyak digunakan pada beberapa aplikasi industri seperti detergen, farmasi, penyamakan kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, dan proses pengolahan limbah industri (Nascimento dan Martin, 2004).

Pada saat ini, enzim yang stabil pada kondisi ekstrim, terutama pada suhu yang tinggi makin dicari khususnya protease yang banyak diminati oleh kalangan industri karena penerapannya yang begitu luas (Purwadaria *et al.*, 2000), pada suhu tinggi, resiko kontaminasi berkurang dan laju reaksi berjalan lebih cepat sehingga prosesnya dirasa makin efisien. Selain itu enzim yang tahan panas pada suhu tinggi telah menjadi pusat perhatian banyak peneliti karena struktur dan sifatnya yang unik (Kim, Yang dan Kim, 2003).

Enzim yang diproduksi mempunyai aktivitas yang tinggi sehingga dapat digunakan dalam aplikasinya, haruslah dilakukan optimasi terhadap mikroorganisme penghasil enzim tersebut (Mubarak, 2001). Optimasi ekstrinsik pada mikroorganisme dilakukan dengan merekayasa kondisi optimal bagi pertumbuhan mikroorganisme (Suhartono, 1991). Peningkatan produksi enzim dengan melakukan rekayasa pada komposisi medium, pH medium, suhu, sumber karbon dan nitrogen (Sumantha, Larroche, and Pandey, 2006). El-Refai *et al.*

(2005), melaporkan produksi protease dari *Bacillus pumilus* F9 memberikan aktifitas tinggi pada pH 9 dan suhu inkubasi 55<sup>0</sup> C. Johnvesly dan Naik (2001), melaporkan bahwa *Bacillus sp.* JB99 dapat tumbuh dan menghasilkan protease alkali pada rentang suhu antara 30-60<sup>0</sup> C dan aktifitas maksimum pada suhu 55<sup>0</sup> C, namun enzim tidak dihasilkan pada suhu dibawah 30<sup>0</sup> C dan diatas 60<sup>0</sup>C.

Agitasi merupakan faktor yang penting dalam penghasilan enzim, karena agitasi akan berpengaruh terhadap homogenitas nutrisi, kultur dan penyediaan oksigen pada medium (Kumar dan Tagaki, 1999). Produksi keratinase dari *Bacillus lichemiformis* KA-08 dengan agitasi 125 rpm memiliki aktivitas spesifik keratinase paling tinggi, yaitu 452 U/mg. Penambahan Agitasi 150 rpm pada produksi keratinase menyebabkan aktivitas keratinase rendah, hal ini disebabkan pada kondisi tersebut pada medium produksi lebih banyak terdapat buih, sehingga bakteri tidak maksimum menghasilkan keratinase (Agustien dan Rilda, 2010). Menurut Stambury dan Whitaker (1984), buih yang ditimbulkan pada medium akibat agitasi yang tinggi dapat penurunan produk fermentasi.

Indonesia memiliki biodiversitas yang tinggi, merupakan salah satu habitat bagi mikroorganisme penghasil enzim yang bersifat termostabil. Daerah/ kawasan sumur hidrotermal merupakan wilayah Indonesia yang belum banyak digali potensinya. (Purwani, Toharisman, Chasanah, 2002). Eksplorasi mikroba termofilik yang potensial penghasil enzim termostabil telah dilakukan di beberapa wilayah di Indonesia. Purwadaria *et al.*, (2000), melakukan eksplorasi mikroba termofilik di Gunung Pancar, Bogor. Sugiyono, Lintang, dan Sabe (2003), melakukan eksplorasi bakteri termofilik yang potensial di mata air laut panas Poso Sulawesi Tengah. Sedangkan di Sumatera, Agustien (2010a), telah melakukan

eksplorasi bakteri termofilik yang potensial dalam menghasilkan protease alkali asal sumber air panas di beberapa wilayah di Sumatera Barat.

Sumatera banyak memiliki sumber air panas yang tersebar di beberapa daerah, salah satunya yang terdapat di Sungai Medang Kecamatan Air Hangat Timur Kabupaten Kerinci Provinsi Jambi. Sumber air panas ini berjarak 4 Km dari Kota Sungai Penuh. Kolam Air Panas ini terdiri atas 5 kolam dengan luas dan selalu mengebulkan asap (Barata, 2012).

Hasil survey yang telah dilakukan, diketahui bahwa suhu kolam air panas tersebut berkisar antara  $50-89^{\circ}\text{C}$  dan pH-nya 8,0-8,7. Sumber bahan organik yang penting sebagai penunjang kehidupan mikroorganisme termofilik seperti dedaunan yang gugur, bangkai serangga, lumut, paku, biji rerumputan ditemukan pada kolam air panas ini. Keberadaan mikroorganisme termofilik pada sumber air panas ini berpotensi untuk dikaji lebih mendalam, mengingat manfaat mikroorganisme termofilik yang begitu penting dalam dunia industri. Eksplorasi bakteri termofilik penghasil protease dari sumber air panas Sungai Medang Kecamatan air Hangat Timur Kabupaten Kerinci. Sampai saat ini belum pernah dilakukan.

Berdasarkan uraian terdahulu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi ekstrinsik parsial bakteri proteotermofilik asal sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci Jambi.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Berdasarkan uraian latar belakang yang dikemukakan diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- 1). Apakah bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas di Sungai Medang, Kabupaten Kerinci Jambi dapat menghasilkan protease?
- 2). Apakah suhu inkubasi, pH medium dan agitasi mempengaruhi bakteri dalam penghasil enzim?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1). Mengetahui kemampuan bakteri termofilik asal sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci Jambi dalam menghasilkan enzim protease.
- 2). Mengetahui pengaruh suhu inkubasi, pH medium dan agitasi terhadap produksi protease.

### **1.4 Hipotesis**

- 1). Bakteri termofilik dari sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci Jambi mampu menghasilkan protease termostabil.
- 2). Optimasi ekstrinsik parsial bakteri termofilik mampu meningkatkan produksi protease.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah didapatkan data tentang isolat bakteri termofil yang berpotensi menghasilkan enzim protease, diperolehnya informasi kondisi optimasi ekstrinsik bakteri termofilik isolat Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi dalam menghasilkan protease. serta memberikan sumbangsih kepada ilmu pengetahuan khususnya di bidang Mikrobiologi dan Enzimologi.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Habitat Mikroorganisme Termofilik

Secara ekologi mikroorganisme termofilik memiliki habitat yang tersebar luas di muka bumi (Edwards, 1990). Pada prinsipnya beberapa habitat tersebut dapat dibedakan menjadi dua bagian yaitu habitat non vulkanik dan habitat vulkanik. (Atlas dan Ronald, 1997). Habitat non vulkanik dengan kisaran suhu 40 – 70<sup>0</sup> C, merupakan habitat yang biasa ditemukan seperti kolam atau tanah yang menjadi panas karena sinar matahari, padang pasir, limbah panas industri dan pengomposan (Atlas dan Ronald, 1997). Habitat vulkanik dengan suhu lebih tinggi daripada 70<sup>0</sup> C bukanlah habitat yang dapat dijumpai dengan mudah. Lingkungan ekstrim dengan suhu yang tinggi di alam terdapat di area panas bumi yang berhubungan dengan kegiatan tektonik seperti sumber air panas, daerah solfatarik, kawah gunung berapi dan hidrotermal laut dalam (Madigan *et al.*, 2000).

Habitat vulkanik terjadi karena adanya aktivitas gunung berapi atau pergeseran kerak bumi akibat adanya pusat aktif tektonik. Aktivitas gunung berapi terjadi dikarenakan adanya aliran magma dari perut bumi, yang bersentuhan dengan aliran air/ sungai di bawah tanah sehingga menimbulkan sumber air panas dan larutan panas (gas dan panas bumi) (Brock, 1986). Sumber air panas terjadi akibat air tanah yang merembes hingga kedalaman 300 m dipanasi oleh magma. Pengembangan panas mendorong air ke permukaan, dimana habitat terbentuk

sebagai sumber air panas dan kolam air panas. Aliran panas yang kaya senyawa mineral sangat dibutuhkan oleh mikroorganisme termofilik (Cowan, 1992).

Beberapa sumber air panas telah dilaporkan mengandung silika atau endapan kalsium karbonat menyebabkan pH alkali dan unsur belerang yang menyebabkan pH rendah seperti ladang solfatara didiami oleh mikroorganisme yang karakteristiknya berbeda dengan mikroorganisme yang tumbuh di lingkungan air panas yang berbatu kapur (Vieilli dan Zeikus, 2001).

Berdasarkan pH sumber air panas dikelompokkan menjadi dua, yaitu sumber air panas asam dengan kisaran pH 1,0–2,5 dan sumber air panas basa dengan kisaran pH 6,0–8,5. Kedua macam sumber air panas tersebut menggambarkan komposisi bahan kimia yang menyusun dua komponen utama sistem penyangga yaitu asam sering kali kaya akan belerang dan besi tapi miskin kandungan mineralnya, sedangkan sumber air panas basa kaya akan mineral. Keadaan tersebut mengakibatkan perbedaan diversitas biotanya (Cowan, 1992).

Sumber air panas dengan pH netral hingga basa, terutama yang terletak di area gunung berapi yang masih aktif, di daerah ini pH air meningkat saat mengalir ke permukaan karena melarutkan mineral terutama  $\text{CO}_2$  walaupun kadang-kadang terdapat  $\text{H}_2\text{S}$  tetapi karena air melimpah, oksidasi belerang di permukaan tidak ada pengaruhnya terhadap pH, di daerah tersebut pH berada di kisaran 9 – 10. Padang solfatara merupakan area panas bumi dengan karakteristik kaya akan mineral belerang, tanah asam, sumber air panas asam dan kubangan lumpur yang menggelegak. Area tersebut terbentuk di daerah yang bersuhu tinggi di lingkungan zona gunung berapi yang masih aktif dengan ciri-ciri suhu air dapat

mencapai  $50 - 350^{\circ}\text{C}$  pada kedalaman  $500 - 5000$  m, serta pelepasan uap air dan gas-gas vulkanik ke permukaan tanah. Gas-gas yang dilepaskan terutama adalah  $\text{N}_2$  dan  $\text{CO}_2$  namun gas  $\text{H}_2\text{S}$  dan  $\text{H}_2$  masing-masing dapat mencapai 10 % dari total gas.  $\text{H}_2\text{S}$  teroksidasi secara kimiawi maupun biologis menjadi belerang kemudian menjadi asam sulfat menyebabkan pH air di permukaan tanah adalah di sekitar pH 2,0 - 2,5 (Kreistjansson dan Hreggvidsson, 1995 *cit.* Wahyuntari, 2001).

Sebaran sumber air panas hampir merata di seluruh dunia, namun ada wilayah-wilayah tertentu dimana sumber air panas itu terkonsentrasi seperti di Jepang, Amerika Serikat Bagian Barat, Selandia Baru, Islandia, Indonesia dan Afrika Selatan (Madigan *et al.*, 2000). Indonesia merupakan salah satu area yang memiliki banyak lokasi tektonik aktif di dunia dengan lebih dari 70 gunung api aktif dan banyak lokasi geotermal (Kusumadinata, 1979 *cit* Baker *et al.*, 2001).

Beberapa bakteri termofilik telah berhasil diisolasi dari sumber air panas di Indonesia, seperti *Bacillus thermoleovorans* dari sumber air panas Cimanggu Jawa Barat (Baker, *et al.*, 2001), *Geobacillus thermoleovorans* isolat dari kawah Wayang Jawa Barat adalah (Indrajaya, Warganegara dan Akhmaloka., 2003). *Geobacillus*, *Anoxybacillus* dan *Thermus* berasal dari sumber air panas kamojang Jawa Barat (Yohandini, Aditiawati dan Akhmaloka., 2008) dan bakteri gram negatif L-23 dari sumber air panas Sulawesi Utara (Lintang *et al.*, 2007). Serta *Brevilacillus agri* A-03 dari sumber air panas Ambayan Muara Labuh Sumatera Barat (Agustien, 2010a).

## 2.2 Mikroorganisme Termofilik

Berdasarkan suhu pertumbuhan, mikroorganisme dapat dibedakan menjadi tiga kelompok yaitu psikrofilik, mesofilik dan termofilik (Trivedi, Gehlor dan Rao., 2006). Mikroorganisme termofilik merupakan mikroorganisme yang tumbuh pada suhu optimum di atas  $45^{\circ}\text{C}$ , sedangkan mikroorganisme dengan pertumbuhan optimum di atas suhu  $80^{\circ}\text{C}$  adalah hipertermofilik. Kebanyakan mikroorganisme termofilik suhu optimumnya di bawah  $80^{\circ}\text{C}$  (Madigan *et al.*, 2000)

Mikroorganisme termofilik dapat dibedakan lagi menjadi 3 kelompok yaitu termofilik fakultatif, termofilik obligat dan termofilik ekstrem. Termofilik fakultatif memiliki suhu maksimum antara  $50-65^{\circ}\text{C}$ , namun tidak dapat tumbuh pada suhu di bawah  $30^{\circ}\text{C}$ , contoh kelompok ini antara lain *Bacillus coagulans* dan beberapa strain *Bacillus stearothermophilus*. Termofilik obligat memiliki suhu maksimum  $65-70^{\circ}\text{C}$  dan tidak dapat hidup di bawah suhu  $40-42^{\circ}\text{C}$ , contoh kelompok ini adalah beberapa strain *Bacillus stearothermophilus*. Termofilik ekstrem memiliki suhu maksimum lebih dari  $70^{\circ}\text{C}$  dengan suhu optimum lebih besar dari  $65^{\circ}\text{C}$  dan suhu minimum lebih dari  $40^{\circ}\text{C}$ , contohnya *Bacillus caldolyticus* dan *Thermus thermophilus*. Ada kelompok mikroorganisme yang hidup baik pada suhu tinggi maupun suhu rendah yang dikenal sebagai mikroorganisme termotoleran. *Bacillus subtilis* memiliki suhu pertumbuhan maksimum  $45-55^{\circ}\text{C}$  dan juga tumbuh di bawah  $30^{\circ}\text{C}$ . Mikroorganisme termofilik paling banyak ditemukan pada lingkungan dengan interval suhu  $55-60^{\circ}\text{C}$  disebut “thermophile boundary” (Brock, 1986). Termofilik ekstrem tersebar luas dan



terdiri dari genus *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermotoga*, *Rhodothermus*, *Fervidobacterium*, *Thermus*, *Thermoanaerobacter* dan *Aquifex* (Gomes dan Steiner, 2004)

Mikroorganisme termofilik mengandung protein tahan panas dan tahan denaturasi sehingga mampu beradaptasi terhadap kondisi lingkungan bersuhu ekstrim untuk hidup dan bertahan hidup (Kumar dan Nussinov, 2001). Bakteri termofilik mampu hidup pada suhu tinggi disebabkan enzim-enzim dan protein hampir semuanya stabil terhadap panas dibandingkan bakteri yang mesofilik. 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. (Madigan *et al.*, 2000).

Mikroorganisme termofilik memiliki kandungan GC yang tinggi dibandingkan dengan mikroorganisme mesofilik, yang menyebabkan terbentuknya asam amino penyusun protein yang memiliki stabilitas yang tinggi. Kodon yang kaya akan GC dilaporkan mengkode asam amino Ala, Pro, Trp, Met, Gly, Glu, Arg dan Val. Mikroorganisme memiliki strategi untuk menghadapi efek suhu terhadap protein sel. Beberapa strategi tersebut adalah substitusi asam amino Arg dengan Tyr, adanya ion sulfat, ion logam sebagai kofaktor, termamin, saferon, fleksibilitas dan kekakuan protein. (Trivedi *et al.*, 2006)

Kebanyakan mikroorganisme memiliki kemampuan untuk mengubah komposisi membran sel jika berada pada lingkungan ekstrem. Kandungan membran sel berupa lipid memegang peranan penting dalam adaptasi terhadap suhu tinggi. Mikroorganisme termofilik memiliki membran sitoplasma yang kaya

akan asam lemak tak jenuh, menyebabkan membran stabil dan efektif pada suhu tinggi. (Rilfors *et al.*, 1978 *cit.* Madigan *et al.*, 2000)

### 2.3 Enzim Protease

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Karena itu enzim ini termasuk kedalam kelas utama enzim hidrolase. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisiko-kimia dan sifat-sifat katalitik yang sangat bervariasi. Enzim ini dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme, serta mempunyai peranan yang penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward, 1983).

Protease ekstraseluler adalah enzim yang sesudah diproduksi di dalam sel, kemudian dikeluarkan dari sel ke substrat disekelilingnya. Enzim-enzim ekstraseluler pada umumnya bersifat terinduksi, yang produksinya akan meningkat jika ada substrat yang sesuai di sekelilingnya, tanpa induksi enzim tetap diproduksi tetapi dalam jumlah kecil. (Fardiaz, 1987).

Berdasarkan sistem klasifikasi IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), membagi protease dalam 3 kelompok dan 4 subkelompok (E.C.3.4). Pengelompokan protease berdasarkan tiga kriteria, yaitu berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis, sifat kimiawi sisi katalitik dan hubungan evolusi struktur enzim (Rao, Madhavendra, Sreenivas, 2008).

Berdasarkan letak ikatan polipeptida yang dihidrolisis, protease dibagi menjadi eksoprotease dan endoprotease. Eksoprotease memutuskan ikatan peptida protein dari ujung rantai polipeptida baik dari ujung amino atau karboksil substrat sehingga menghasilkan asam amino dan sisa peptida, sedangkan endoprotease memutuskan ikatan peptida pada bagian dalam protein sehingga menghasilkan sejumlah peptida (Sumantha *et al.*, 2006).

Berdasarkan pH optimum, protease dapat dikelompokkan menjadi protease netral, protease asam dan protease alkali. Berdasarkan spesifisitas substrat, protease terdiri dari (1) keratinase, aktif pada substrat keratin, (2) elastase, aktif pada substrat elastin, (3) kolagenase, aktif pada substrat kolagen. Berdasarkan homologi protein, protease terdiri atas, tripsin, pepsin, mirip tripsin, dan mirip pepsin. (Sumantha *et al.*, 2006)

Berdasarkan sisi aktif dan sensitifitas terhadap inhibitor, Hartley membagi endoprotease dalam 4 kelompok : (1) protease asam atau protease karboksil, (2) protease sistein atau protease tiol. (3) protease logam dan (4) protease serin. Protease asam (E.C.3.4.23) memiliki residu asam amino aspartat pada sisi aktif. Protease serin (E.C.3.4.18 dan E.C.3.4.22) memiliki gugus SH pada sisi aktifnya. Protease logam (E.C.3.4.17 dan E.C.3.4.24), memerlukan kation pada sisi aktifnya. Protease serin (E.C.3.4.16 dan E.C.3.4.21) memiliki residu serin pada sisi aktifnya. (Rao *et al.*, 2008)

Selanjutnya Morihara membagi protease serin dalam empat subkelompok : (1) protease serupa tripsin (2) protease alkali (3) protease  $\alpha$ -litik *Myxobacter* dan (4) protease *Staphylococcus*. Protease dihasilkan dari berbagai organisme seperti

tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Mikroorganisme penghasil protease pada umumnya adalah bakteri dan jamur (Rao *et al.*, 2008) berbagai macam bakteri yang mampu menghasilkan protease *Bacillus* sp, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus* dan *Serratia* merupakan sumber protease yang cukup potensial. Dari jenis jamur antara lain adalah dari genus *Aspergillus* dan *Rhizopus*.

Protease banyak digunakan pada beberapa aplikasi industri seperti detergen, farmasi, penyamakan kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, dan proses pengolahan limbah industri (Nascimento dan Martin, 2006)

#### **2.4 Enzim Termotabil**

Kelemahan enzim yang utama adalah sifatnya yang rapuh terhadap lingkungan ekstrim (khususnya suhu) dan proses produksinya padat modal. Enzim-enzim yang sekarang digunakan dalam berbagai industri umumnya bersifat tidak tahan panas. Hingga saat ini peranan enzim-enzim pangan yang bersifat termotabil menjadi semakin penting dalam dunia industri. Hal ini berkaitan dengan keuntungan yang akan diperoleh bila proses produksi dilakukan pada suhu tinggi, diantaranya adalah mengurangi kontaminan, meningkatkan, kecepatan transfer masa dan menurunkan viskositas larutan (Ningthoujam dan Kshetri, 2010)

Eksplorasi mikroba termofilik yang menghasilkan enzim termotabil telah dilakukan oleh Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Penelitian Bioteknologi IPB sejak tahun 1997. *Bacillus* K29-14 yang diisolasi dari Kawah kamojang dilaporkan menghasilkan enzim kitinase dan kitin deasetilase yang stabil pada suhu 55° C. Enzim kitinase diketahui memiliki berat molekul 63 kDa



(Rahayu, 2004). Rochima (2000) mengkarakterisasi kitin diasetilase yang dihasilkan *Bacillus papandayan* yang berasal dari kawah Kamojang Jawa Barat yang berguna dalam menghasilkan produk-produk turunan yang penting dalam industri obat, kosmetik, pangan, pertanian, pengolahan limbah dan bioteknologi.

Enzim protease termotabil dan mikroorganisme yang menghasilkannya juga berhasil dipelajari berbagai sumber air panas. Protease termotabil yang mempunyai aktivitas optimal pada suhu 65° C dihasilkan oleh isolat SP3 yang diisolasi dari sumber air panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara (Pakpahan, 2009)

## **2.5 Optimasi Ekstrinsik**

Langkah pertama dalam perkembangan produksi enzim untuk industri adalah mengisolasi jenis mikroorganisme yang potensial untuk produksi enzim yang memiliki nilai komersial (Sumantha, *et al.*, 2006). Produk ekstraseluler dari mikroorganisme seperti enzim diseleksi menggunakan metode uji cawan dan kemampuan mikroorganisme menghasilkan enzim dapat berhubungan dengan zona bening yang terbentuk dari hasil hidrolisis substrat disekeliling koloni. Beberapa usaha telah dilakukan untuk meningkatkan produksi enzim sehingga dapat digunakan dalam penerapannya, salah satunya dengan melakukan optimasi terhadap mikroorganisme penghasil enzim tersebut (Mubarak, 2001).

Berbagai penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa produksi enzim protease oleh bakteri termofilik dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti faktor fisika, kimia dan nutrisi. Faktor nutrisi didalamnya termasuk sumber karbon, sumber nitrogen, dan ion logam. Disamping faktor nutrisi, faktor fisika

seperti konsentrasi inokulum, aerasi, suhu, pH, dan waktu inkubasi juga secara signifikan mempengaruhi produksi enzim protease (Shafee, Aris, Rahman, Basri, Salleh, 2005).

Optimasi ekstrinsik mikroorganisme dilakukan dengan merekayasa kondisi optimal bagi sintesis enzim, yang berarti pula merekayasa kondisi optimal bagi pertumbuhan mikroorganisme (Suhartono, 1991).



### **III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Agustus 2012 di Laboratorium Riset Mikrobiologi jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

#### **3.2 Bahan dan Alat**

##### **3.2.1 Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :**

Sampel air panas, Reagen Folin ciocalteau's (Merck), Trichloro acetic acid (TCA) (Merck), L-Tirosin (Merck), Bovine Serum Albumin (Merck),  $K_2HPO_4$  (Ajax Chemicals),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Merck), NaCl (Merck), Casein Hammarsten (Merck),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Merck),  $KH_2PO_4$  ( Ajax chemicals),  $Na_2CO_3$  (Merck), Glukosa (Merck), Maltosa (Merck), Laktosa (Merck), Sukrosa (Merck),  $KNO_3$  (Merck),  $NaNO_3$  (Merck),  $NH_4Cl$  (Merck),  $(NH_4)_2SO_4$  (Merck),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (Merck), NaOH (Merck), Aquades steril, Alkohol.

##### **3.2.2 Alat-alat dan instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah :**

Botol sampel steril, Kertas pH universal, Sentrifuse Model Hermile Z-300, Autoclave, Timbangan digital Ohaus, Tabung eppendorf, Test tube, Cawan petri, Hot plate, Environmental inkubator, Beker glass, Jarum ose, Mikropipet, Erlenmeyer, Mikroskop, Jarum ose, Gelas ukur, Magnetik stirer, Lampu bunsen, Pipet tetes, pipet hisap, Vortex, Tabung cuvet, Spektrofotometer UV-Vis, Haemositometer, Laminar air flow, Freezer.

### **3.3 Metode Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di lapangan dan laboratorium dengan metode deskriptif dan eksperimental yang terdiri dari tiga tahap :

1. Pengambilan sampel di sumber air panas Sungai Medang ,Kabupaten Kerinci Jambi.
2. Isolasi dan penapisan bakteri penghasil protease termostabil.
3. Optimasi lingkungan ekstrinsik parsial bakteri penghasil protease termostabil.

#### **3.3.1 Pengambilan Sampel**

##### **Metoda Penelitian :**

Metoda penelitian ini adalah deskriptif, sampel air diperoleh dari lokasi sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi. Pengambilan sampel air dilakukan pada sumber air panas lima lokasi dengan kisaran suhu 50 - 78<sup>o</sup>C. Lokasi I diambil 2 sampel air panas pada 2 kolam dengan suhu sekitar 78<sup>o</sup>C, 78<sup>o</sup>C, Lokasi II diambil 3 sampel air panas 3 kolam dengan suhu 50<sup>o</sup>C, 77<sup>o</sup>C, 77<sup>o</sup>C. Lokasi III diambil 1 sampel air panas dengan suhu 50<sup>o</sup>C. Lokasi IV diambil 1 sampel air panas dengan suhu 70<sup>o</sup>C. Sedangkan lokasi V diambil 2 sampel air panas pada 1 kolam dengan kisaran suhu 74<sup>o</sup>C, sehingga diperoleh total sampel sebanyak 9 sampel air panas dengan masing-masing dua ulangan.

##### **Prosedur Kerja :**

Pengambilan sampel air, dilakukan dengan menggunakan botol steril ukuran 250 ml sebanyak 100 ml sampel air diambil dari 10 cm dibawah permukaan air pada lokasi sumber air panas yang bersuhu antara 50-78<sup>o</sup>C (Agüstien, 2010a). Dilakukan juga pengamatan fisis air seperti : suhu, pH, warna



air, bau air. pengamatan faktor biotik juga dilakukan seperti vegetasi yang ada disekitar kolam.

### **3.3.2. Isolasi Bakteri Proteotermofilik**

Dilaboratorium sampel air dalam botol diinkubasi pada suhu yang sama dengan suhu asalnya selama 2 jam. Kemudian sebanyak 1ml dipipet secara aseptik pada petridish. Selanjutnya dituangnya NA sebanyak 15 ml. Petridish digoyang agar sampel homogen. Diinkubasi pada suhu 50 ° C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diinokulasikan pada tabung reaksi sebagai biakan miring dan diberi kode.

### **3.3.3 Penapisan Bakteri Proteotermofilik**

Penapisan dilakukan dengan menginokulasikan semua koloni tunggal dalam medium Skim Milk Agar (SMA) dengan cara sebanyak 1 ose koloni diinokulasikan pada media. Diinkubasi pada suhu 50° C selama 2 hari. Bakteri yang membentuk zona bening hasil penapisan diukur kemampuan proteolitiknya berdasarkan indeks proteolitik (IP), diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$\text{Indeks proteolitik} = \frac{D1 - D2}{D2}$$

Dimana :

D1 = diameter zona bening

D2 = diameter koloni

### **3.3.4. Uji Aktivitas Enzim Protease**

Aktivitas enzim protease diukur dengan metode Bergmeyer dan Ward (1984) yang dimodifikasi. Substrat yang digunakan adalah Kasein Hammarsten 1% sebagai induser dilarutkan kedalam buffer posfat (50 mM, pH 8) (dibuat

dalam keadaan segar). 1 ml substrat kemudian direaksikan dengan 1 ml enzim selama 10 menit pada suhu 50°C. reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml asam trikloro asetat (TCA) 10% inkubasi selama 10 menit pada suhu 50°C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Pada 1 ml supernatan ditambahkan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan pereaksi Folin Ciocalteau's (1:2), campuran diinkubasi 20 menit pada suhu 50°C. absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Aktivitas protease ditentukan dengan cara menginterpolasikan nilai absorbansi dengan persamaan regresi dari kurva standar tirosin yang didapatkan. Blanko dibuat dengan cara yang sama, namun enzim di inaktifkan dahulu dengan direaksikan dengan 1 ml TCA. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 µmol tirosin permenit pada suhu dan pH optimum. (Sugiyono *et al.*, 2003)

### 3.3.5 Uji Kadar Protein Enzim

Kadar protein dari filtrat enzim diukur dengan menggunakan metode Lowry (1976) ; Sugiyono *et al.* (2003). Kadar protein dalam sampel dapat ditentukan dengan 1 ml sampel enzim ditambahkan 0,9 ml pereaksi C lalu dikocok dan didiamkan selama 15 menit. tambahkan pereaksi pewarna folin ciocalteau's sebanyak 3 ml lalu di kocok dan di diamkan selama 30 menit. Lalu tentukan absorbansi spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Kadar protein enzim ditentukan dengan menginterpolasikan nilai absorbansi dengan persamaan regresi kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) yang didapatkan. Blanko ditentukan dengan cara 1ml aquades dicampur dengan 0,9 ml pereaksi C dan 3 ml pereaksi folin ciocalteau (Sugiyono., *et al*, 2003)

### 3.3.6 Pengukuran Aktivitas Spesifik Protease

Aktivitas spesifik enzim protease (U/mg) merupakan rasio dari aktivitas protease (U/ml) terhadap kadar protein (mg/ml) (Sugiyono, *et. al.*, 2003).

### 3.3.7 Profil Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Kurva Aktivitas Enzim

Profil kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas enzim dilakukan untuk menentukan profil pertumbuhan 5 isolat bakteri proteolitik dan aktivitas enzim serta kinetika pertumbuhannya, menurut metode El-Refai *et al.* (2005) dan Fardiaz (1987).

#### Prosedur Kerja :

Sebanyak 10 ml inokulum ( $10^7$  sel/ml) diinokulasikan kedalam 190 ml medium basal. Sampling dilakukan dengan cara sebanyak 1 ml kultur dipipet dari medium produksi enzim setiap interval 2 jam selama 48 jam untuk penghasilan protease. Jumlah bakteri ditentukan dengan metode "pour plate", melalui serangkaian pengenceran dari sampel, kemudian 1 ml hasil pengenceran dipipetkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan medium Nutrien Agar (NA) dan diinkubasi pada suhu  $60^{\circ}$  C selama 24 jam. Jumlah bakteri (sel/ml) dapat dihitung dengan mengkalikan jumlah koloni dengan faktor pengenceran. Ditentukan aktivitas spesifik protease. Dibuat grafik hubungan jumlah bakteri sel/ml dengan aktivitas spesifik protease. Dari grafik ini diperoleh data waktu untuk pengisolasian enzim. Data kinetika pertumbuhan konstanta pertumbuhan ( $\mu$ ), waktu generasi ( $t_g$ ) dan jumlah generasi ( $k$ ) ditentukan dengan menggunakan formula kinetika pertumbuhan (Fardiaz, 1987)

Konstanta kecepatan pertumbuhan dapat dihitung dengan formula

$$\mu = \frac{2,303 (\log N - \log N_0)}{t - t_0}$$

Waktu generasi dapat dihitung dengan formula :

$$\text{Waktu generasi : } t_g = 0,693 / \mu$$

Jumlah generasi dapat dihitung dengan formula :

$$\text{Jumlah generasi : } k = \mu / 0,693$$

### 3.3.8 Optimasi Ekstrinsik Bakteri Proteotermofilik

Optimasi ekstrinsik terhadap bakteri Proteotermofilik yang dilakukan adalah suhu, pH, inokulum dan jenis medium.

#### 3.3.8.1 Efek Suhu Inkubasi

Efek suhu inkubasi terhadap produksi enzim dilakukan dengan membuat variasi suhu inkubasi : 50<sup>0</sup> C, 60<sup>0</sup> C, 70<sup>0</sup> dan, 80<sup>0</sup> C. Ditentukan aktivitas spesifik enzim pada pH medium produksi 8,0 dan agitasi 150 rpm. Menurut metode Suntornsuk dan Suntornsuk (2003) yang dimodifikasi.

#### 3.3.8.2 Efek pH Medium Produksi

Efek pH medium produksi enzim dilakukan dengan membuat variasi pH medium : pH 7,5; 8,0; 8,5 dan 9,0 pada suhu inkubasi optimum dan agitasi 150 rpm. Ditentukan aktivitas spesifik enzim. Menurut metode Suntornsuk dan Suntornsuk (2003) yang dimodifikasi.



### **3.3.8.3. Efek Agitasi**

Efek agitasi terhadap produksi enzim dilakukan dengan membuat variasi agitasi ; 125; 150; 175 dan 200 rpm pada suhu inkubasi dan pH medium optimum. Ditentukan aktivitas enzim. Menurut metode Suntornsuk dan Suntornsuk (2003) yang dimodifikasi.



## VI. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Isolasi Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi

Hasil isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi, disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi Fisis dan biotik dan jumlah isolat yang didapatkan dari beberapa titik pengambilan sampel

Lokasi sampel air panas	Karakteristik		Jumlah isolat
Lokasi I	Titik pengambilan sampel	Vegetasi disekitar sumber air panas	
	1 : 78 <sup>0</sup> C, pH 8,45	Lumut, serasah, sampah anorganik,	6 isolat
	2 : 60 <sup>0</sup> C, pH 8,53	Lumut, sampah, serasah, bebatuan	20 isolat
Lokasi II	1 : 50 <sup>0</sup> C, pH 8,62	Banyak lumut, serasah, ilalang	4 isolat
	2 : 77 <sup>0</sup> C, pH 8,71	Ranting, bebatuan	6 isolat
	3 : 70 <sup>0</sup> C, pH 8,57	Berlumut, berbatuan	6 isolat
Lokasi III	50 <sup>0</sup> C, pH 8,54	Berbatu, Tumbuhan paku dan ranting	8 isolat
Lokasi IV	70 C, pH 8,59	Rumput, lumut	8 isolat
Lokasi V	1 : 74 <sup>0</sup> C, pH 8,62	Berbatu, serasah, ada vegetasi tumbuhan	6 isolat
	2 : 74 <sup>0</sup> C, pH 8,55	Berbatu, serasah tumbuhan	6 isolat

Tabel 1. menunjukkan bahwa 70 isolat bakteri termofilik telah berhasil diisolasi dari sumber air panas sungai medang, Kabupaten Kerinci, Jambi. 26 isolat diperoleh paling banyak dari lokasi I dengan interval suhu 52- 78<sup>0</sup> C, pH 8 , pada lokasi II dengan interval suhu 70-77<sup>0</sup> C, pH8 diperoleh 16 isolat. Lokasi III yang bersuhu 70<sup>0</sup> C didapatkan 8 jumlah isolat, Lokasi IV suhu 70<sup>0</sup> C, didapatkan

8 isolat dan lokasi V yang bersuhu  $74^{\circ}\text{C}$  didapatkan dengan jumlah 12 isolat. Lebih banyaknya isolat termofilik yang terdapat pada lokasi I, titik pengambilan sampel dua, hal ini disebabkan pada titik pengambilan sampel tersebut terdapat sampah dan suhu yang mendukung banyaknya isolat. Brock (1986), menjelaskan bahwa mikroorganisme termofilik pada lingkungan dengan interval suhu  $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$  yang disebut “thermophile boundary”.

Adanya bakteri termofilik pada sumber air panas ini disebabkan kondisi lingkungan sumber air panas yang mendukung kehidupan bakteri tersebut seperti faktor abiotik dan faktor biotik. Tabel 1 dan Gambar 1 memperlihatkan kondisi biotik di lingkungan sumber air panas yang mana terdapat tumbuhan dan bahan-bahan organik lainnya yang ditemukan di sekeliling sumber air panas tersebut. Dirnawan *et al.* (2000) mengatakan bahwa kondisi biotik seperti dedaunan yang gugur, ranting dahan, biji rerumputan, serbuk sari dan bangkai serangga yang terdapat dalam sumber air panas merupakan bahan organik yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi oleh mikroorganisme yang hidup dalam sumber air panas tersebut.



Gambar 1. Tumbuhan dan dedaunan gugur disekitar sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi

Berdasarkan hasil pengukuran pH terhadap sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi, menunjukkan bahwa tiap-tiap lokasi menunjukkan memiliki kondisi pH yang relatif sama yakni pH 8, hal ini menandakan bahwa tiap lokasi tergolong sumber air panas yang bersifat basa. Menurut Cowan (1992) mengemukakan bahwa berdasarkan pH, sumber air panas dikelompokkan menjadi dua, yaitu sumber air panas asam dengan kisaran pH 2,0-3,0 dan sumber air panas basa dengan kisaran pH 6,0-8,5. Sumber air panas asam sering kali kaya akan belerang dan besi tetapi miskin mineralnya, sedangkan sumber air panas basa kaya akan mineralnya. Keadaan tersebut mengakibatkan perbedaan diversitas biotanya.

#### **4.2. Penapisan Bakteri Proteotermofilik dari Sumber Air Panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi**

Hasil penapisan yang telah dilakukan terhadap kemampuan proteolitik isolat bakteri termofilik asal sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi pada medium Susu Skim Agar menunjukkan bahwa 39 isolat bakteri termofilik mengindikasikan bersifat proteolitik yaitu dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri, sedangkan 31 isolat tidak bersifat proteolitik, hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening disekitar koloni. Terbentuknya zona bening disekitar koloni menandakan bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim protease. Dirnawan (2000) menjelaskan bahwa zona bening adalah hasil dari pendegradasian protein dalam medium tersebut. Adanya zona bening pada medium yang mengandung kasein, mengindikasikan bahwa



bakteri tersebut bersifat proteolitik. Zona bening terbentuk akibat bakteri mensekresikan enzim protease pada medium susu skim agar dan menghidrolisis kasein sehingga partikel kasein dalam medium menghilang sehingga medium menjadi lisis (zona bening).



Gambar 2. Aktivitas protease isolat bakteri proteotermofilik pada medium Susu skim agar setelah 48 jam inkubasi pada suhu 50<sup>0</sup> C.

Gambar 2 menunjukkan zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri termo-proteolitik. Dengan adanya enzim protease ekstraseluler dari bakteri, kasein yang terdapat didalam medium susu skim akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut. Fuad, Rahmawati, Mubarik (2004) juga menjelaskan bahwa terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada medium padat yang mengandung kasein disebabkan bakteri tersebut menghasilkan protease yang kemudian disekresikan ke medium, protease akan menghidrolisis substrat kasein sehingga menyebabkan medium kelihatan bening. Menurut Pakpahan (2009), susu merupakan medium yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrisi. Kasein merupakan protein yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam

kalsium yang disebut kalsium kalseinat. Terbentuknya zona bening pada medium skim karena adanya aktivitas bakteri termofilik yang menghasilkan enzim protease. Dengan adanya enzim proteolitik ekstraseluler bakteri, kasein akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut. Hilangnya partikel kasein di dalam media susu skim ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri, yang merupakan indikator bahwa isolat-isolat bakteri tersebut mampu merombak kasein dalam susu skim. Menurut Susanti (2002) susu skim mengandung kasein yang disertakan ke dalam medium pertumbuhan bakteri berfungsi sebagai substrat enzim. 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.

Tabel 1. menunjukkan 39 isolat proteolitik memiliki Indeks Proteolitik (IP) berkisar antara 0,13 sampai dengan 7,89. Sastramihardja (1988) *cit.* Reka (2002) menjelaskan apabila disekitar koloni terdapat daerah bening  $\geq 2$  cm, maka dapat dikatakan bakteri itu termasuk galur yang baik untuk menghasilkan enzim protease. Agustien (2010b) melaporkan ditemukan 8 isolat dari sumber air panas sumatera barat dengan indeks proteolitik diatas 2 memiliki koloni dengan diameter 12 mm sampai 3,50. Prayitno dan Ardiansyah (2009) melaporkan ditemukan 3 isolat bakteri termofilik yang memiliki IP  $\geq 2,6$  dan ditemukan 6 isolat yang memiliki IP  $\geq 9$ . Akhdiya (2003) menguji kemampuan proteolitik dari 737 isolat yang bersifat proteolitik dan 29 isolat yang memiliki IP sama atau lebih dari 3,00.

Tabel 2. Indeks proteolitik masing-masing isolat Sumber Air Panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, Jambi

No.	Kolam	Suhu	Kode Isolat	Hasil		Indeks Proteolitik (IP)
				Diameter Koloni	Diameter Zona Bening	
1	I	78°C	MI2.3	0,6	3,3	4,5
2			MI2.4	9,3	14,6	0,57
3			MI2.9	7,2	16,5	1,22
4			MI2.10	7	19,7	1,81
5	II	52°C	MII1.2	6,4	8,3	0,297
6			MII1.10	4,8	11,6	1,417
7			MII1.11	8,75	10,45	0,194
8			MII1.13	2,2	6	1,727
9		MII1.18	0,8	4,6	4,75	
10		MII1.16	3,65	10,4	1,85	
11		77°C	MII2.1	1,8	16,6	7,89
12			MII2.2	15,1	17,74	0,175
13			MII3.16	21,1	24,35	0,154
14		70°C	MII3.21	2,4	12,6	4,25
15		MII3.23	9,6	14,05	0,464	
16	III	50°C	MIII1.1	1,4	5,8	3,143
17			MIII1.2	4	8,8	1,2
18			MIII1.3	3,9	7,9	1,026
19			MIII1.4	4,4	11,4	1,591
20			MIII1.5	3,9	7,5	0,923
21			MIII1.6	5,7	14,3	1,509
22			MIII1.7	5,5	9,2	0,673
23			MIII1.8	7,1	13,7	0,93
24	IV	70°C	MIV1.7	5,2	7,7	0,455
25			MIV1.8	8,7	10,85	0,247
26			MIV1.9	6	12,1	1,017
27	V	74°C	MV1.1	8,15	9,7	0,19
28			MV1.5	0,9	4,7	4,22
29			MV1.6	1,4	4,1	1,929
30			MV1.7	4,5	7,3	0,622
31			MV1.8	9,42	17,45	0,852
32			MV1.10	5,4	6,1	0,13
33			MV2.2	2,7	5,3	0,963
34			MV2.3	15,1	18	0,192
35			MV2.4	2,02	10,13	4,015
36			MV2.6	6	11	0,83
37			MV2.7	4,4	6,1	0,387
38			MV2.8	8,6	12,35	0,436
39	MV2.10	2,7	5,6	1,074		

Tabel 2. Menunjukkan kisaran nilai indeks proteolitik yang dihasilkan 39 isolat penghasil protease antara 0,13 sampai 7,89. Isolat yang memiliki nilai indeks proteolitik yang tertinggi pada isolat MII2.1 yaitu 7,89 yang di dapatkan pada lokasi II pada titik ke 2 dengan suhu 77<sup>0</sup>C dan pada pH 8,71. isolat yang mempunyai indeks proteolitik terendah terdapat pada isolat MV1.10 yaitu sebesar 0,13 yang lokasinya terletak pada kolam V di titik 1 dengan suhu 74<sup>0</sup>C dengan pH 8,55. Pada Tabel 1. dapat juga dilihat bahwa 7 isolat memiliki indeks proteolitik lebih dari 2 yaitu 7,89 pada isolat MII2.1, 4,75 pada isolat MIII1.18, 4,5 pada isolat MI2.3, 4,25 pada isolat MII3.21, 4,22 pada isolat MV1.5, 4,015 pada isolat MV2.4 dan 3,143 pada isolat MIII1.1. Fitri (2011) melaporkan bahwa ditemukan 50 isolat penghasil protease pada sumber air panas Semurup Jambi dengan 20 isolat mempunyai indeks proteolitiknya diatas 2

Tabel 2 juga menunjukkan bakteri proteo-termofilik hidup pada kondisi lingkungan kisaran suhu 50<sup>0</sup> C sampai 78<sup>0</sup> C. Empat isolat hidup pada kondisi lingkungan bersuhu 78<sup>0</sup> C dengan pH 8,45, 2 isolat pada kondisi lingkungan bersuhu 77<sup>0</sup>C dengan pH 8,71, 14 isolat pada kondisi lingkungan bersuhu 50<sup>0</sup> C dengan pH 8,62 dan 8,57, 6 isolat pada kondisi lingkungan bersuhu 70<sup>0</sup> C dengan pH 8,54 dan 8,57; 13 isolat pada kondisi lingkungan bersuhu 74<sup>0</sup>C dengan pH 8,55 dan 8,59. Menurut Kumar dan Nussinov (2001), mikroorganisme termofilik mengandung protein tahan panas dan tahan denaturasi sehingga mampu beradaptasi terhadap kondisi lingkungan bersuhu ekstrim untuk hidup dan bertahan hidup. Brock (1986) menyatakan bahwa mikroorganisme termofilik mempunyai enzim dan protein yang lebih resisten terhadap panas dibandingkan dengan bakteri mesofilik dan psikrofilik. Selain itu komponen-komponen pembentuk protein dan struktur pada membran sel bersifat tahan panas. Akhdiya



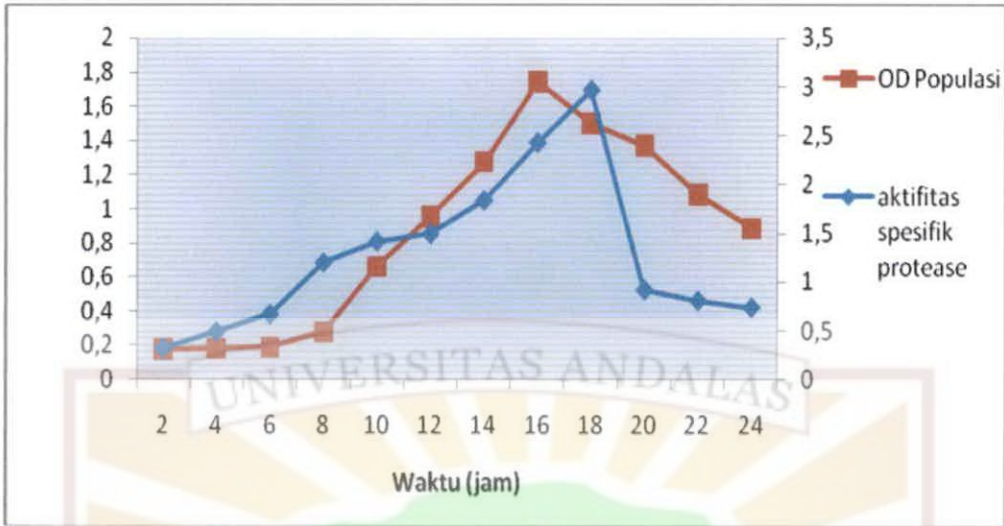
(2003) mengatakan bahwa dalam industri fermentasi penggunaan mikroorganisme termofilik lebih menguntungkan, terutama karena dapat mengurangi risiko kontaminasi. Selain itu, juga dapat mengurangi biaya untuk kebutuhan pendingin fermentor. Bakteri termofilik yang mampu hidup pada air panas yang bersuhu 50-90<sup>0</sup> C mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mempunyai enzim dan protein-protein yang bersifat termostabil. Menurut Brock (1986) menyatakan bahwa mikroorganisme termofilik punya enzim dan protein-protein yang lebih resisten terhadap panas dibandingkan dengan bakteri mesofilik dan psikrofilik. Selain itu komponen-komponen pembuat protein dan struktur pada membran sel bersifat tahan terhadap panas.

#### **4.3. Profil Kurva Pertumbuhan Bakteri Proteotermofilik Isolat Sungai Medang Kabupaten Kerinci Jambi dan Kurva Aktivitas Spesifik Protease**

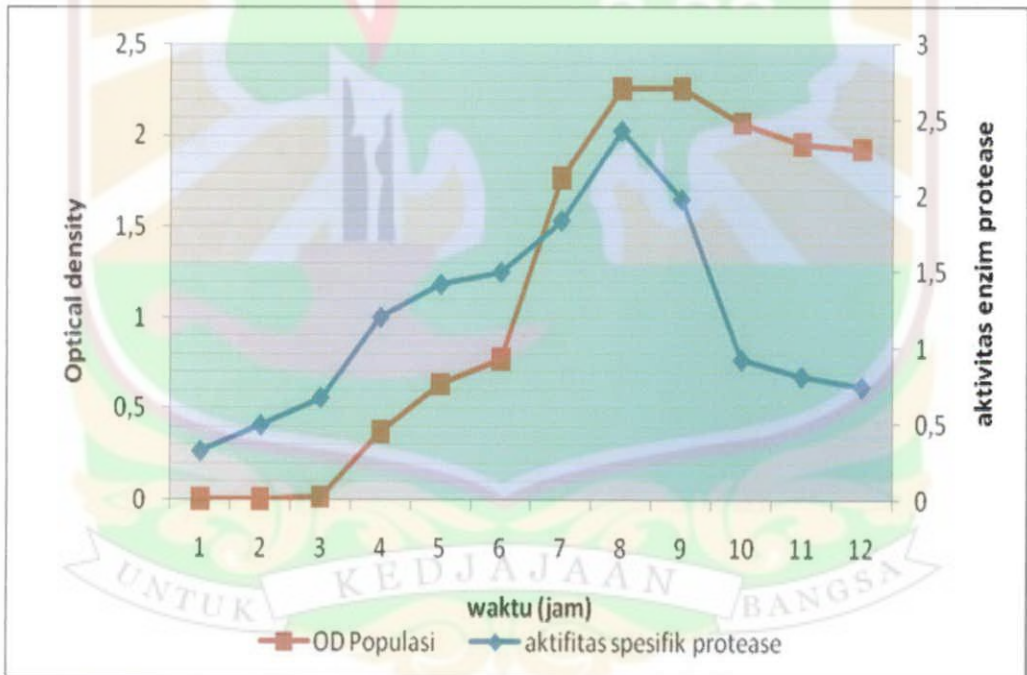
Hasil dari pengamatan profil kurva pertumbuhan Bakteri proteo-termofilik isolat sungai medang Kabupaten Jambi dan kurva aktivitas spesifik protease disajikan pada Gambar dibawah ini.

##### **4.3.1. Kurva Pertumbuhan Isolat proteo-termofilik Sungai Medang Kabupaten Kerinci Jambi**

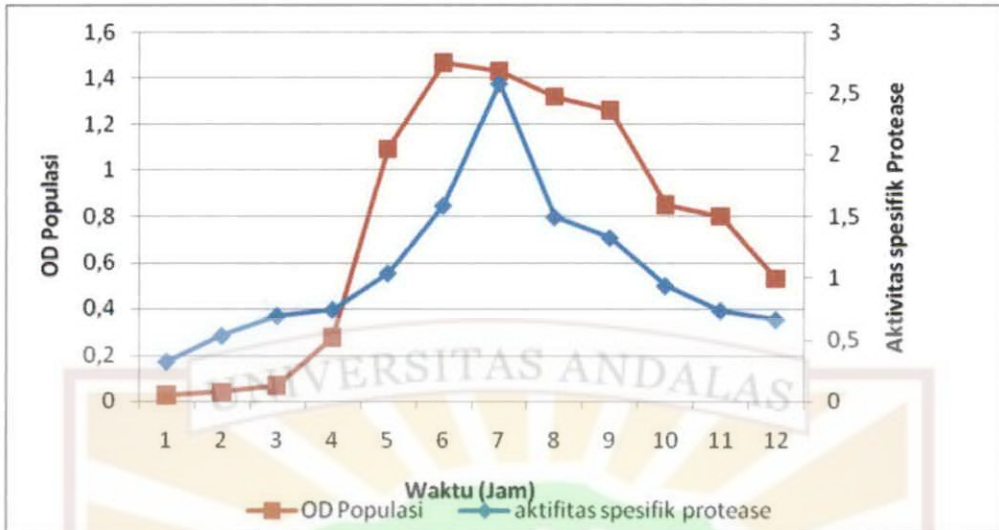
Kurva pertumbuhan lima isolat proteo-termofilik asal sumber air pans Sungai Medang Kabupaten Kerinci Jambi yang memliki IP lima teratas, disajikan pada Gambar berikut :



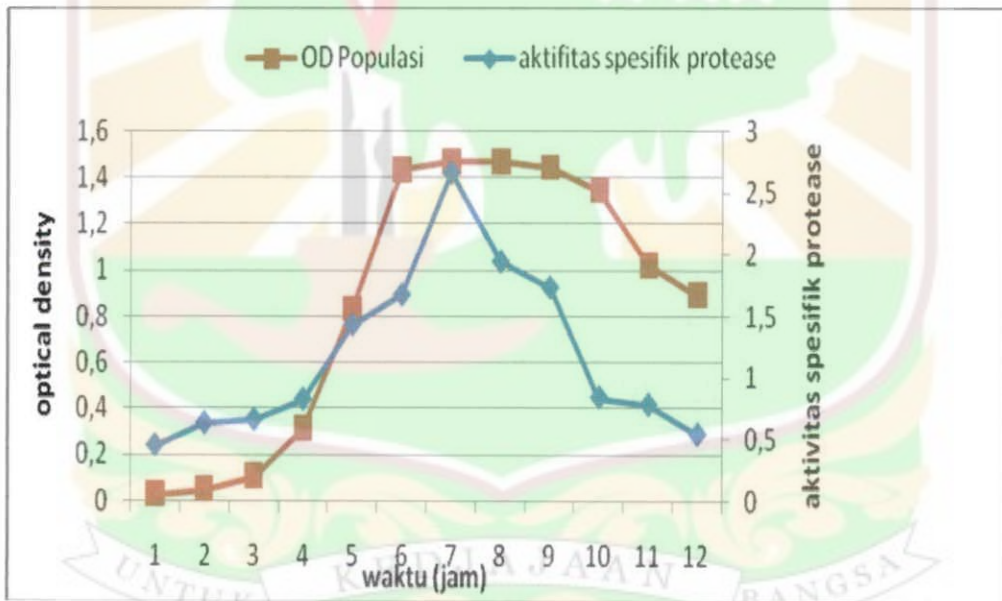
Gambar 3. Profil pertumbuhan dan aktivitas spesifik protease dari isolat MV.1.6



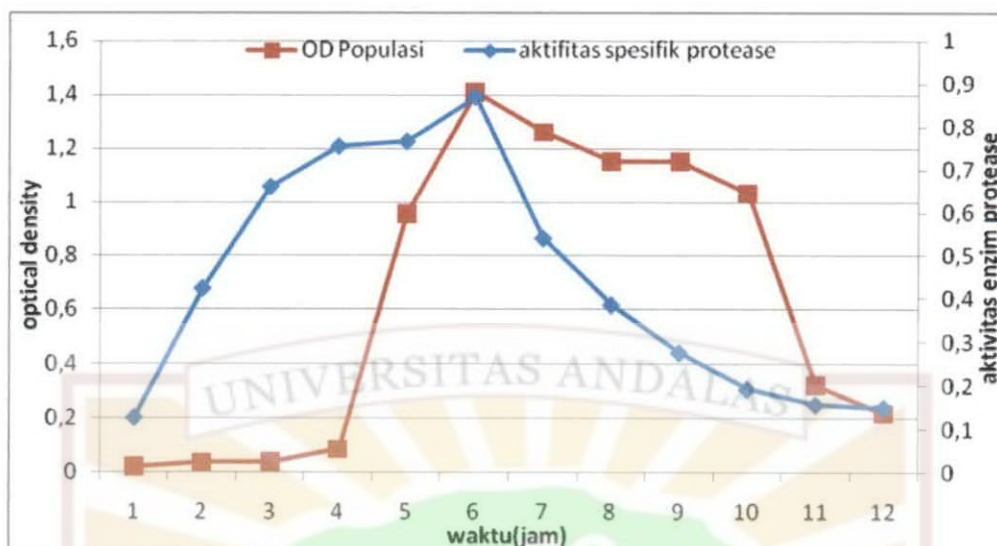
Gambar 4. Profil pertumbuhan dan aktivitas spesifik protease dari isolat MII.1.18



Gambar 5. Profil pertumbuhan dan aktivitas spesifik protease dari isolat MI.2.3



Gambar 6. Profil pertumbuhan dan aktivitas protease dari isolat MII.3.21



Gambar 7. Profil pertumbuhan dan aktivitas spesifik protease dari isolat MV.1.5

Berdasarkan kurva pertumbuhan kelima isolat diatas diketahui bahwa pertumbuhan Isolat MV1.6 mengalami fase lag paling lama yakni selama  $\pm 5$  jam. Sedangkan isolat MI.2.3 mengalami fase lag terpendek yakni  $\pm 1,5$  jam. Waktu adaptasi dari Isolat Isolat MI.2.3 ini dapat dikatakan singkat. Volk dan Wheeler (1993) mengatakan bahwa pada fase lag ini berlangsung selama satu jam hingga beberapa hari bergantung pada jenis bakteri, umur biakan dan nutrisi yang terdapat dalam medium. Dari hasil pengamatan kurva pertumbuhan juga terlihat bahwa Pada fase ini enzim protease sudah mulai dihasilkan. Enzim ini digunakan sel untuk melakukan metabolisme. Menurut Maier, Pepper, Gerba (1999) pada fase lag, enzim ekstraseluler mulai dikeluarkan oleh sel untuk proses metabolisme dan pertumbuhan.

Setelah sel bakteri mengalami fase pertumbuhan awal maka sel bakteri memasuki fase eksponensial (log) pada jam ke-6 untuk isolat M.V.1.6 sedangkan isolat MI.2.3 memasuki fase log pada jam ke-2 dan isolat MII.1.18, isolat



MII.3.21, isolat MV.1.5 berturut-turut yakni pada jam ke-4, 2, 3. pada fase ini sel mulai membelah dengan kecepatan yang sangat cepat dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang eksponensial. Menurut Hafiz (2011) mengatakan bahwa bakteri termofilik *Bacillus TPT-20* memulai fase lag pada jam ke-4 sampai jam ke-12. Menurut Kosim dan Putra (2010) *cit.* Hafiz (2011) bahwa pada fase log ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya dan pada fase ini sel banyak menghasilkan zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhannya.

Dari kurva diatas diketahui bahwa enzim protease dihasilkan mulai jam ke-2 setelah inkubasi dan maksimum Protease biasanya dihasilkan maksimum pada jam 12-16 jam setelah inkubasi. Produksi protease dari mikroorganisme dapat berlangsung pada (1) selama fase eksponensial, (2) dimulai pertengahan fase eksponensial dan (3) fase stasioner (Kumar and Nussinov, 2001). Dan Jumlah bakteri mulai menurun pada 17 jam inkubasi (fase kematian). Pada fase ini zat makanan yang diperlukan bakteri mulai berkurang dan hasil ekskresi bakteri mulai tertimbun dalam medium, sehingga mengakibatkan terganggunya perkembangan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya.

Hasil perhitungan terhadap kinetika pertumbuhan Isolat MV.1.6 menunjukkan bahwa konstanta laju pertumbuhan  $\mu = 0,65 \text{ jam}^{-1}$ , waktu generasi  $t_g = 65$  menit, dan jumlah generasi  $k = 0,94$  generasi/jam. Sedangkan isolat MII.1.18 menunjukkan konstanta laju pertumbuhan  $\mu = 0,86 \text{ jam}^{-1}$ , waktu generasi  $t_g = 55$  menit, dan jumlah generasi  $k = 0,86$  generasi/jam, isolat MII.3.21

menunjukkan konstanta laju pertumbuhan  $\mu = 0,60 \text{ jam}^{-1}$ , waktu generasi  $t_g = 62$  menit, dan jumlah generasi  $k = 0,90$  generasi/jam, isolat MV. 1.5 menunjukkan laju konstanta pertumbuhan  $\mu = 0,94 \text{ jam}^{-1}$ , waktu generasi  $t_g = 76$  menit, dan jumlah generasi  $k = 1,2$  generasi/jam. Sedangkan isolat MI.2.3 menunjukkan konstanta pertumbuhan  $\mu = 0,45 \text{ jam}^{-1}$ , waktu generasi  $t_g = 40$  menit, dan jumlah generasi  $k = 0,75$  generasi/jam. Masing-masing isolat memiliki kinetika pertumbuhan yang berlainan seperti laju pertumbuhan dan waktu generasi yang berbeda, tergantung pada jenis bakteri.

#### **4.4. Optimasi Ekstrinsik Bakteri Proteotermofilik**

##### **4.4.1 Efek Suhu Inkubasi Terhadap Aktivitas Spesifik Protease**

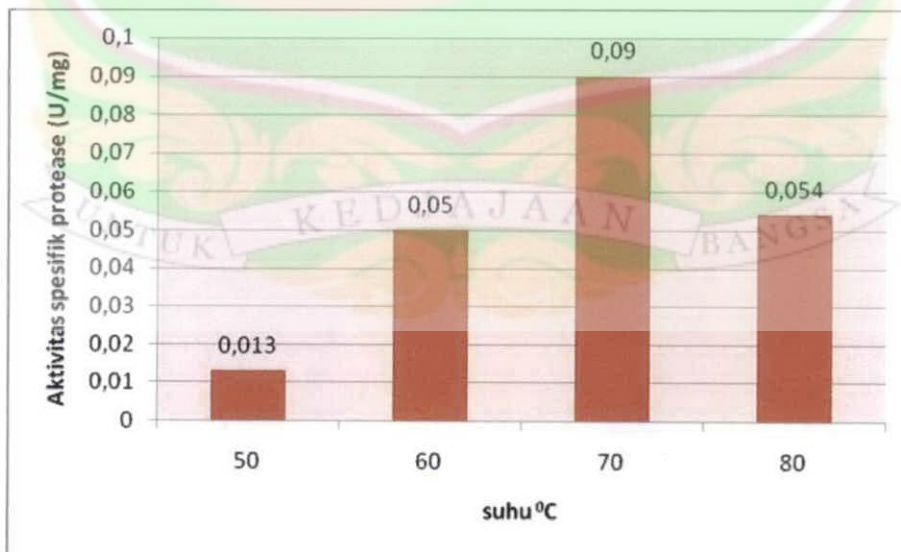
Efek suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada isolat MI.2.3, suhu inkubasi  $60^{\circ}\text{C}$  memiliki aktivitas spesifik protease paling tinggi yaitu  $0,94 \text{ U/mg}$  sedangkan isolat MV.1.6 pada suhu inkubasi  $50^{\circ}\text{C}$  menunjukkan aktivitas spesifik protease yang paling rendah dengan nilai  $0,013 \text{ U/mg}$ . Agustien (2010), melaporkan bahwa *Brevibacillus agri* A-03 yang diisolasi dari sumber air panas Ambayan Sumatera Barat merupakan isolat yang paling tinggi penghasil protease pada suhu  $55^{\circ}\text{C}$  dengan aktivitas spesifik enzim  $1,45 \text{ U/mg}$ . Menurut Moat dan Foster (1995), suhu merupakan faktor yang sangat penting bagi pertumbuhan mikroorganisme, suhu yang ekstrim akan mengakibatkan inaktivasi enzim atau fungsi struktur sel, seperti membran, akan tetapi suhu optimum yang berbeda dari setiap mikroorganisme memberikan efek aktivitas metabolisme yang maksimum.

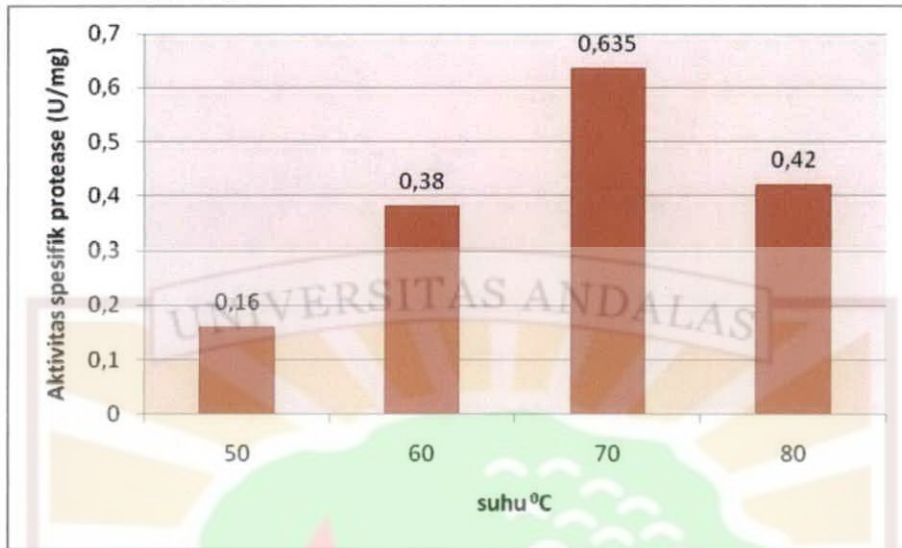
Tabel 3. Rata-rata aktivitas spesifik protease (U/mg) pada suhu inkubasi yang berbeda, pH 8,0 dan agitasi 150 rpm

Isolat	Suhu ( $^{\circ}$ C)			
	50	60	70	80
MV.1.6	0,013	0,050	0,090	0,054
M II.1.18	0,16	0,38	0,635	0,42
MI.2.3	0,08	0,94	0,467	0,33
MII.3.21	0,28	0,16	0,11	0,09
MV. 1. 5	0,03	0,43	0,1629	0,09

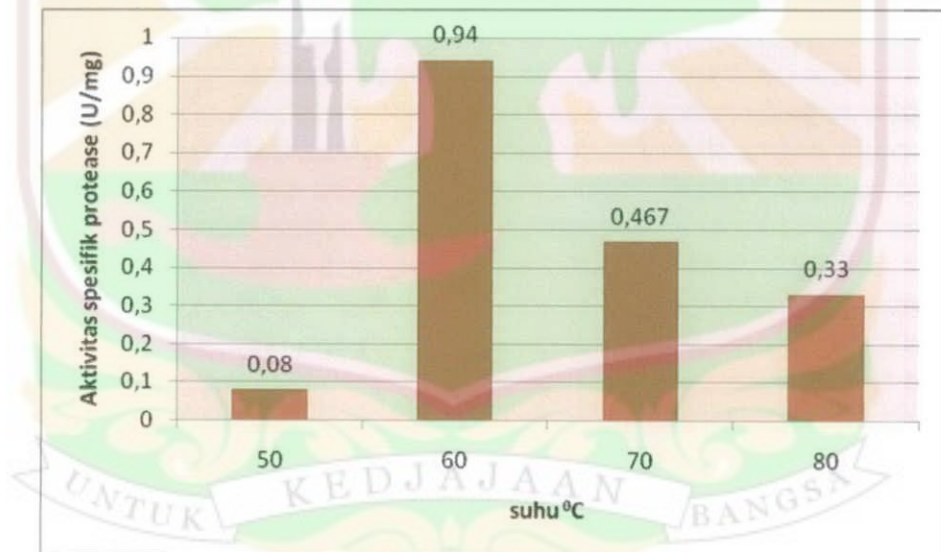
Nascimento dan Martins (2004), melaporkan bahwa aktivitas protease dari *Bacillus sp.* Strain SMIA-2 Termofilik memberikan aktivitas enzim tertinggi pada suhu 55 - 60 $^{\circ}$  C yakni sebesar 0,6  $\bar{U}$ /mg dan 0,8  $\bar{U}$ /mg protein. Efek suhu terhadap aktivitas spesifik protease dari masing-masing isolat disajikan pada Gambar 8,9,10, 11 dan 12.



Gambar 8. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.6.

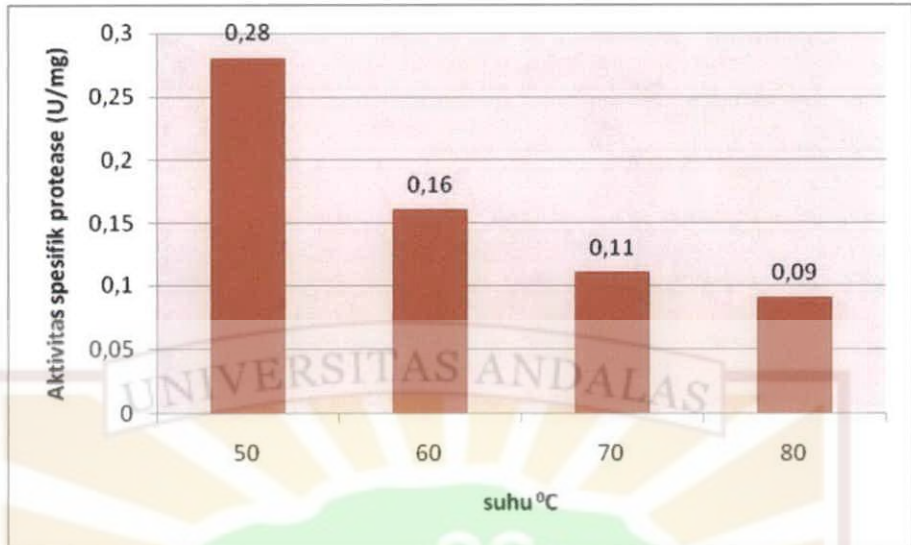


Gambar 9. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.1.18

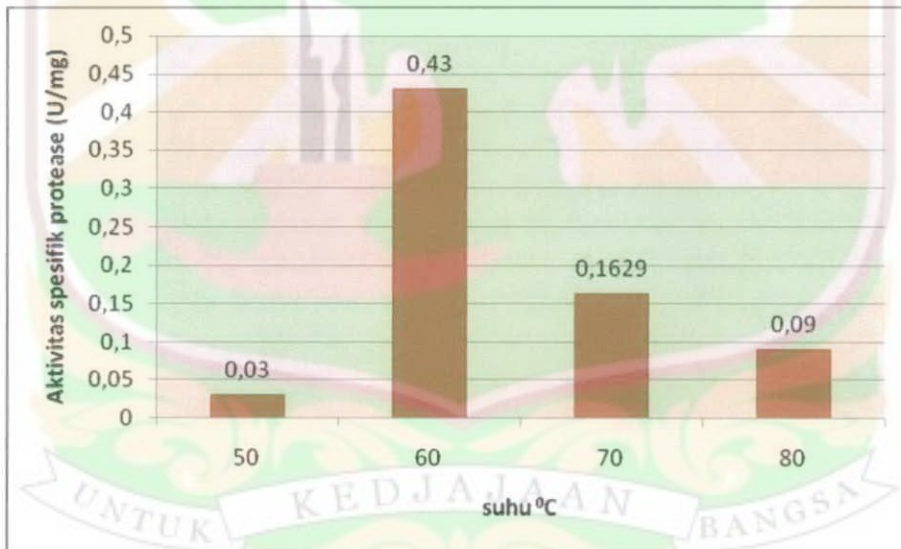


Gambar 10. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MI.2.3





Gambar 11. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.3.21



Gambar 12. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.5

Gambar 8, 9, 10, 11 dan 12 menunjukkan bahwa isolat MV.1.6; MII.1.18; MI.2.3; MII.3.21 dan MV.1.5 dapat menghasilkan protease pada rentang suhu 50 sampai 80°C dengan suhu optimumnya masing-masing 70, 70, 60, 50 dan 60°C. Walaupun suhu optimum isolat MV1.6 dan MII.1.18 sama yaitu pada suhu 70°C, namun aktivitas spesifik proteasenya sangat berbeda yaitu 0,09 dan 0,635 U/mg. Begitu juga halnya dengan isolat MI.2.3 dan MV1.5 suhu optimumnya sama pada suhu 60°C, aktivitas proteasenya masing-masing 0,94 dan 0,43 U/mg. Isolat MI.2.3 memiliki suhu optimum 50°C dengan aktivitas spesifik protease 0,28 U/mg.

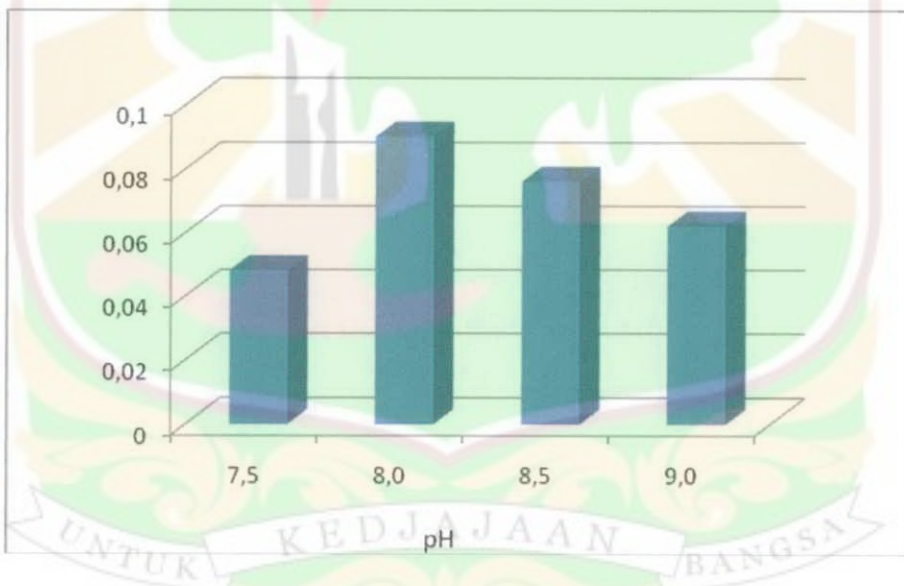
Isolat-isolat tersebut tumbuh dan menghasilkan protease pada rentang suhu optimum yang luas antara 50-70°C, dengan kondisi seperti ini, isolat-isolat sangat potensi menghasilkan enzim termostabil. Haki dan Rakshit (2003), melaporkan bahwa *Bacillus strearothermophilus* F1 menghasilkan protease pada suhu 60°C. *Bacillus brevis*, *Bacillus clausii* dan *Bacillus mojavenstis* menghasilkan protease pada suhu optimum 60°C (Banerjee et al., 1999; Joo et al., 2006 dan Gupta dan Beg, 2003). Sedangkan Johnvesly dan Naik (2001), melaporkan bahwa *Bacillus* sp. JB99 dapat tumbuh dan menghasilkan protease alkali pada rentang suhu yang luas antara 30 sampai 60°C dengan protease maksimum dihasilkan pada suhu 55°C. Agustien (2010), melaporkan bahwa *Brevibacillus agri* A-03 menghasilkan protease alkali pada suhu optimum 55°C. Penelitian Takami et al., 1992, suhu optimum *Bacillus* sp. AH-01 dalam menghasilkan protease adalah pada suhu 80°C.

#### 4.4.2 Efek pH Medium Terhadap Aktivitas Spesifik Protease

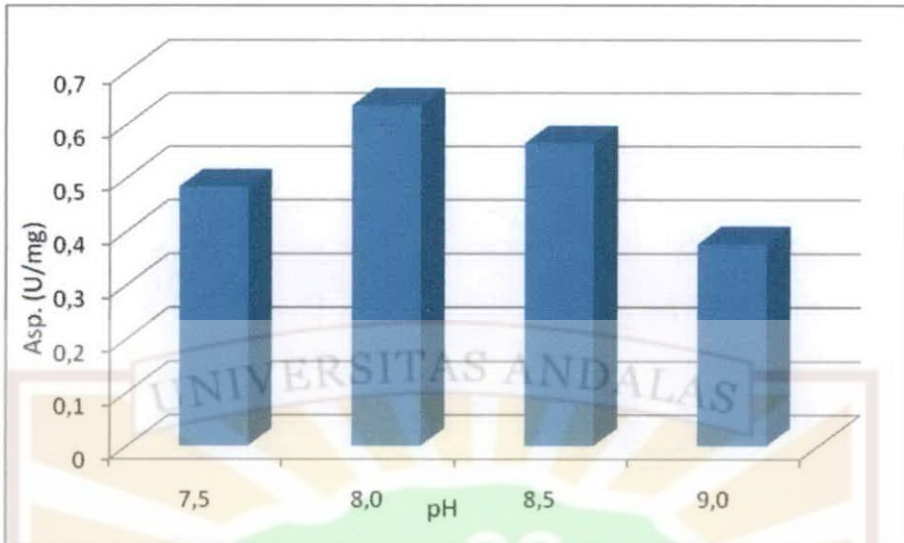
Efek pH medium terhadap aktivitas spesifik protease dari masing-masing isolat disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata aktivitas spesifik protease (U/mg) pada pH medium yang berbeda, suhu inkubasi optimum dan agitasi 150 rpm

Isolat	pH medium			
	7,5	8	8,5	9
MV.1.6	0,048	0,090	0,076	0,062
MII.1.18	0,483	0,635	0,564	0,376
MI.2.3	0,965	0,940	0,128	0,076
M.II.3.21	0,460	0,280	0,171	0,106
MV.1.5	0,850	0,430	0,112	0,086



Gambar 13. Diagram batang efek pH medium terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.6

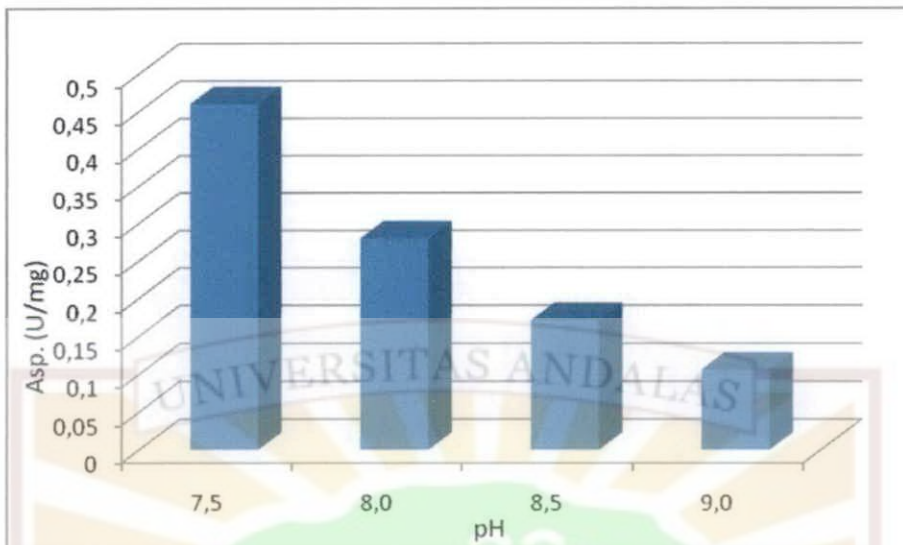


Gambar 14. Diagram batang efek pH medium terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.1.18

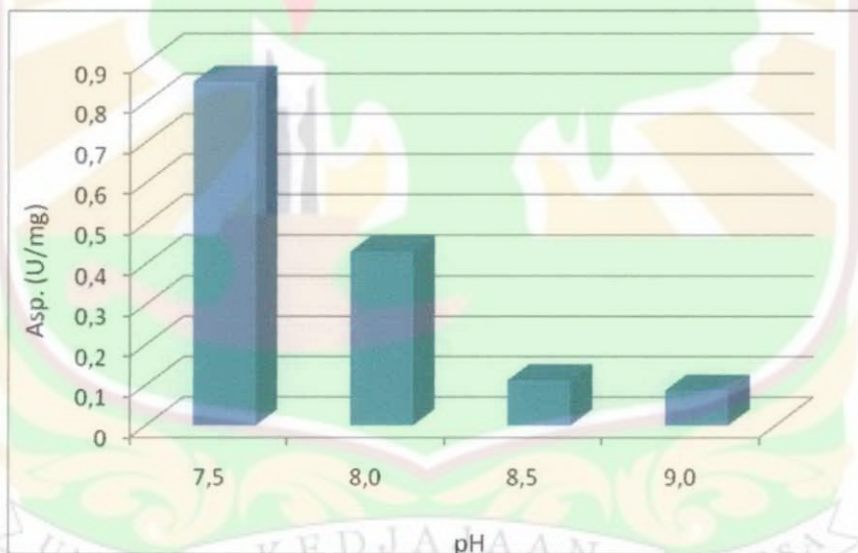


Gambar 15. Diagram batang efek pH medium terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MI.2.3





Gambar 16. Diagram batang efek pH medium terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.3.1



Gambar 17. Diagram batang efek pH medium terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.5

Gambar 13, 14, 15, 16 dan 17 menunjukkan bahwa isolat MV.1.6; MII.1.18; MI.2.3; MII.3.21 dan MV.1.5 dapat menghasilkan protease pada rentang pH medium pada penghasilan enzim : pH 7,5 sampai pH 9,0 dengan pH

medium optimumnya masing-masing pH 8,0; 8,0; 7,5; 7,5 dan pH 7,5. Walaupun pH optimum isolat MV1.6 dan MII.1.18 sama yaitu pada pH 8,0, namun aktivitas spesifik proteasenya sangat berbeda yaitu 0,09 dan 0,635 U/mg. Begitu juga halnya dengan isolat MI.2.3 ; MII.3.21 dan MV1.5 dan pH optimumnya sama pada pH 7,5 aktivitas proteasenya masing-masing 0,965; 0,46 dan 0,85 U/mg.

Isolat-isolat tersebut tumbuh dan menghasilkan protease pada rentang pH optimum yang antara yang mendekati netral sampai pH alkali yaitu 7,5–8,0, dengan kondisi seperti ini, isolat-isolat sangat potensi menghasilkan enzim yang bersifat alkali. Olajuyigbe dan Ajele, (2005), melaporkan bahwa tiga jenis *Bacillus* yang diisolasi dari sumber air panas Ikogosi Nigeria, dapat menghasilkan protease alkali termostabil pada kondisi medium pH 8,0. Sedangkan El Refai *et al.*, (2005), produksi protease dan keratinase dari *Bacillus pumilus* F9 menggunakan medium dengan pH 9,0. Begitu juga halnya bakteri termofilik *Brevibacillus agri* A-03; dapat menghasilkan protease alkali pada rentang pH 7 sampai 10, dengan pH optimumnya 9,0. (Agustien (2010). Menurut Glazer dan Nakaido (1995), kondisi fermentasi merupakan faktor penting untuk penghasilan enzim yang ditumbuhkan pada lingkungan alkali menghasilkan enzim proteolitik yang alkali lebih tinggi dibandingkan bila bakteri tersebut ditumbuhkan pada lingkungan netral.

#### **4.4.3 Efek Agitasi Terhadap Aktivitas Spesifik Protease**

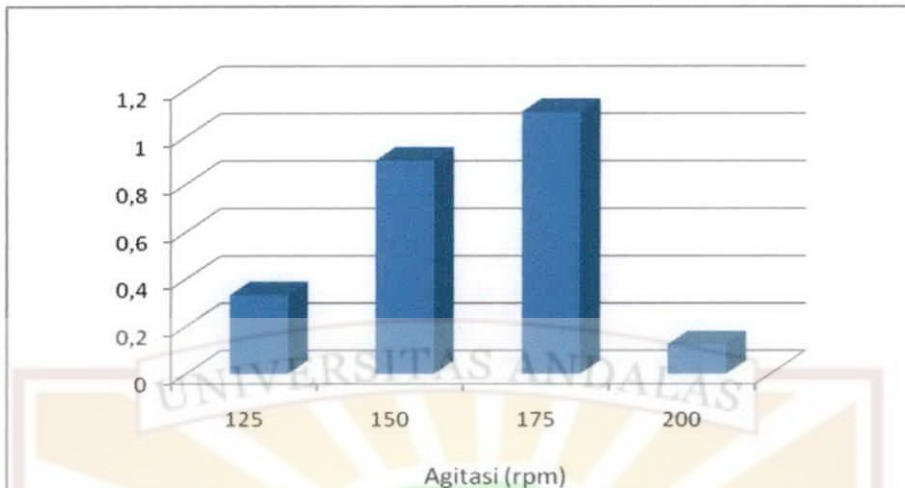
Efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease dari masing-masing isolat disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Rata-rata aktivitas spesifik protease (U/mg) pada agitasi yang berbeda, suhu dan pH optimum

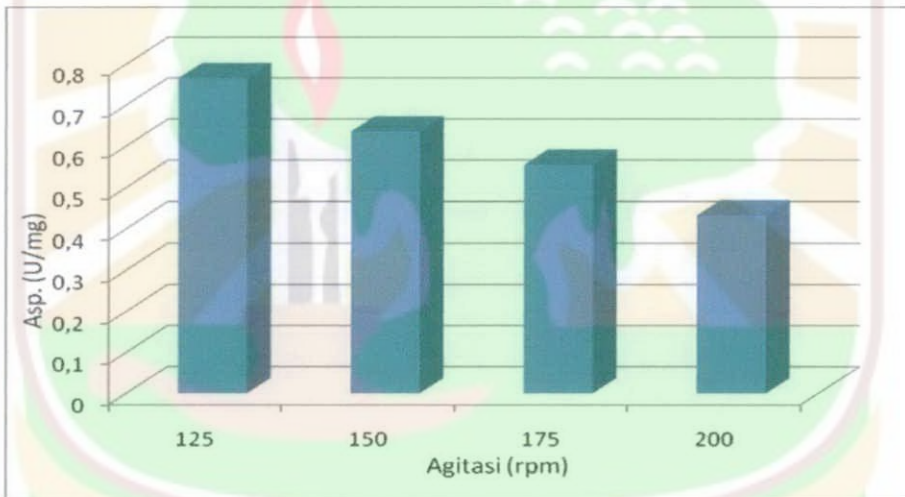
Isolat	Agitasi (rpm)			
	125	150	175	200
MV.1.6	0,332	0,900	1,105	0,124
MII.1.18	0,765	0,635	0,554	0,432
MI.2.3	1,87	0,965	0,546	0,324
MII.3.21	0,876	0,460	0,421	0,405
MV.1.5	1,245	0,850	0,534	0,321

Tabel 5 diatas menunjukkan bahwa tiap isolat mampu untuk menghasilkan enzim protease pada tiap agitasi yang berbeda, tetapi agitasi yang berbeda memberikan efek terhadap aktivitas spesifik protease yang berbeda-beda.

Isolat MV.1.6, menghasilkan protease dengan aktivitas enzim maksimum pada agitasi 175 rpm sedangkan isolat-isolat lainnya aktivitas enzim maksimum pada agitasi 125 rpm. Produksi enzim dengan menggunakan isolat MV.1.6 memerlukan pengocokan yang lebih cepat dibandingkan dengan isolat lainnya. Naiola dan Widhyastuti (2007), menjelaskan bahwa peningkatan dan penurunan aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah agitasi. Kumar dan Takagi (1999), mengatakan bahwa agitasi merupakan faktor yang penting dalam penghasilan enzim, karena agitasi akan berpengaruh terhadap homogenitas nutrisi, kultur dan penyediaan oksigen pada medium.

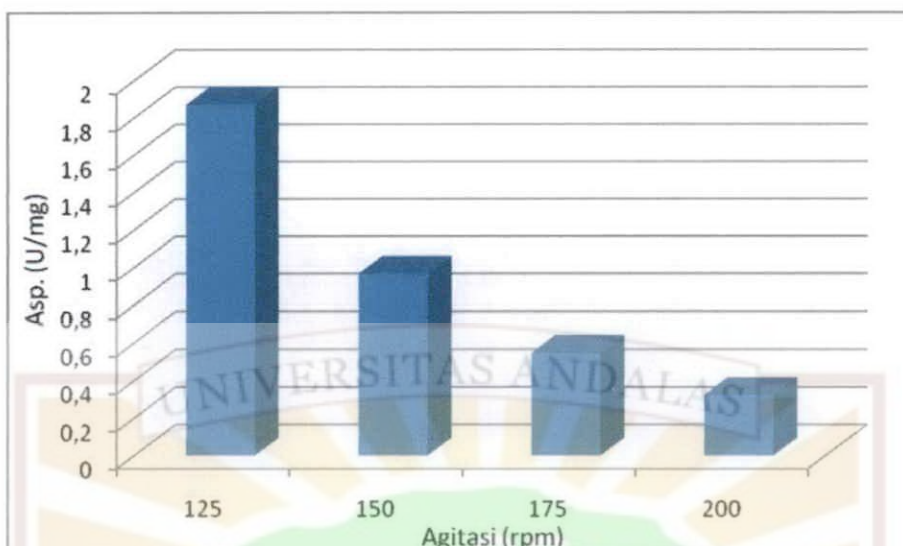


Gambar 18. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.6

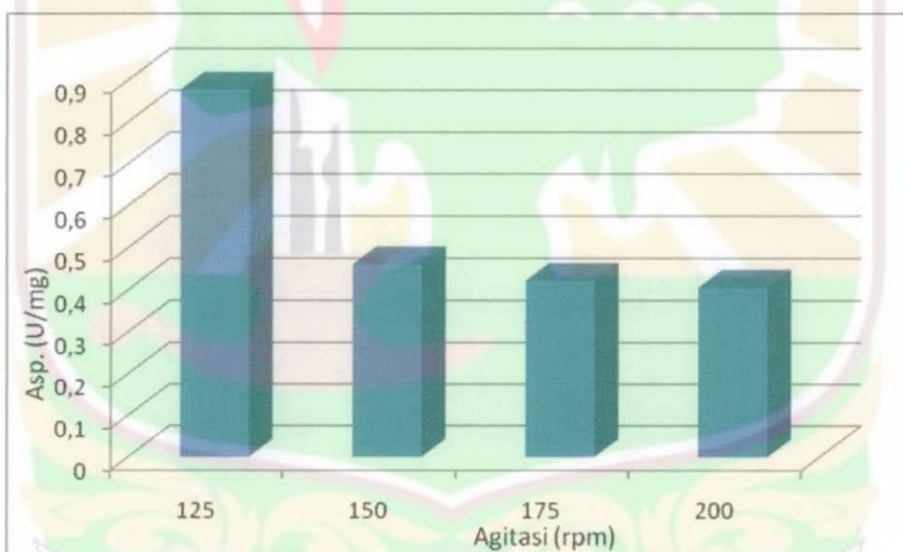


Gambar 19. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.1.18

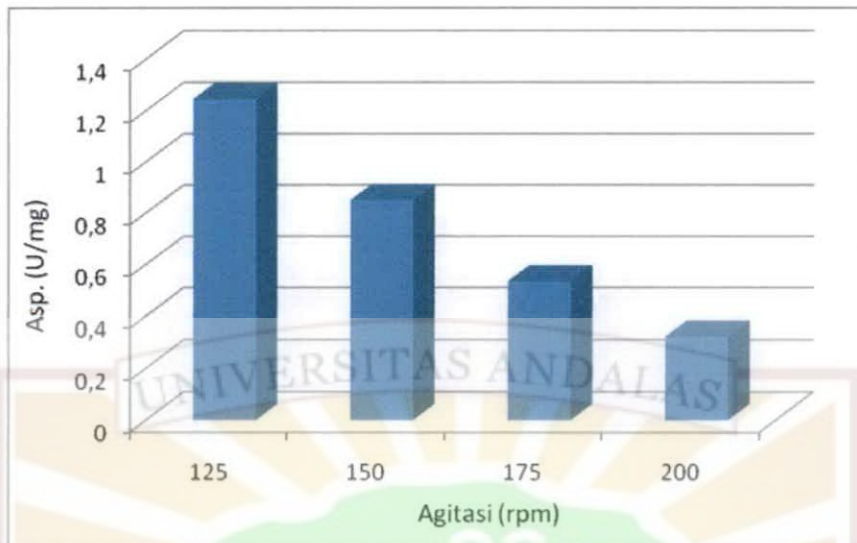




Gambar 20. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MI.2.3



Gambar 21. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MII.3.21



Gambar 22. Diagram batang efek agitasi terhadap aktivitas spesifik protease pada isolat MV.1.5

Gambar 18 sampai 22, menunjukkan efek agitasi terhadap aktivitas protease dari masing-masing isolat. Pada Gambar 18, terjadi peningkatan aktivitas enzim mulai dari agitasi 125 sampai 175 rpm, kemudian aktivitas enzim menurun sangat drastis pada agitasi 200 rpm. Fenomena ini kemungkinan disebabkan pada agitasi 200 rpm, pengocokan terlalu cepat sehingga terjadinya buih sehingga bakteri tidak maksimum menghasilkan enzim. Sedangkan isolat-isolat lainnya menunjukkan fenomena semakin kuat pengocokan maka semakin menurun aktivitas enzim yang dihasilkan bakteri. Stanbury dan Whitaker (1984), melaporkan buih yang ditimbulkan pada medium akibat agitasi yang tinggi dapat menyebabkan penurunan produk fermentasi.

#### 4.4.4. Aktivitas Protease pada Kondisi Optimasi Masing-Masing Isolat

Aktivitas protease pada kondisi optimasi masing-masing isolat disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Kondisi optimasi isolat bakteri termofilik penghasil protease

No	Isolat	Suhu ( C)	pH	Agitasi (rpm)	Asp. (U/mg)
1	MV.1.6	70	8,0	175	1,105
2	MII.1.18	70	8,0	125	0,765
3	MI.2.3	60	7,5	125	1,87
4	MII.3.21	50	7,5	125	0,876
5	MV.1.5	60	7,5	125	1,245

Tabel 6 menunjukkan bahwa kondisi optimasi masing-masing isolat dalam penghasilan protease adalah berbeda, kecuali isolat isolat MI.2.3 dan isolat MV.1.5. Kondisi optimasi isolat MI.2.3 dan isolat MV.1.5 adalah sama yaitu pada suhu 60°C, pH 7,5 dan agitasi 125 rpm. Namun aktivitas enzimnya berbeda, masing-masing 1,87 dan 1,245 U/mg. Agustien (2010), melaporkan bahwa kondisi optimasi *Brevibacillus agri* A-03, dalam penghasilan protease alkali adalah suhu 55°C, pH 9,0 dan agitasi 150 rpm. *Bacillus licheniformis* KA-08 kondisi optimasinya dalam penghasilan protease yang spesifik (keratinase), suhu 50°C, pH 8,0 dan agitasi 175 rpm (Agustien dan Rilda, 2011).

Optimasi parsial terhadap isolat bakteri, menunjukkan bahwa isolat MI.2.3, memiliki aktivitas enzim tertinggi yakni 1,87 U/mg, kemudian diikuti isolat MV.1.5; MV.1.6; MII.3.21 dan MII.1.18 dengan aktivitas protease masing-masing sebesar 1,245; 1,105; 0,876 dan 0,765 U/mg. Lebih tingginya aktivitas

spesifik protease dari isolat MI.2.3 dari isolat-isolat lainnya hal ini kemungkinan disebabkan lebih banyak atau tingginya konsentrasi protease yang dihasilkan, sekuen dan jumlah asam amino dari protease. Suhartono (1990), mengatakan bahwa aktivitas suatu enzim ditentukan oleh jumlah atau konsentrasi enzim, urutan dan jumlah asam amino pembentuk protein enzim.





## V. KESIMPULAN DAN SARAN

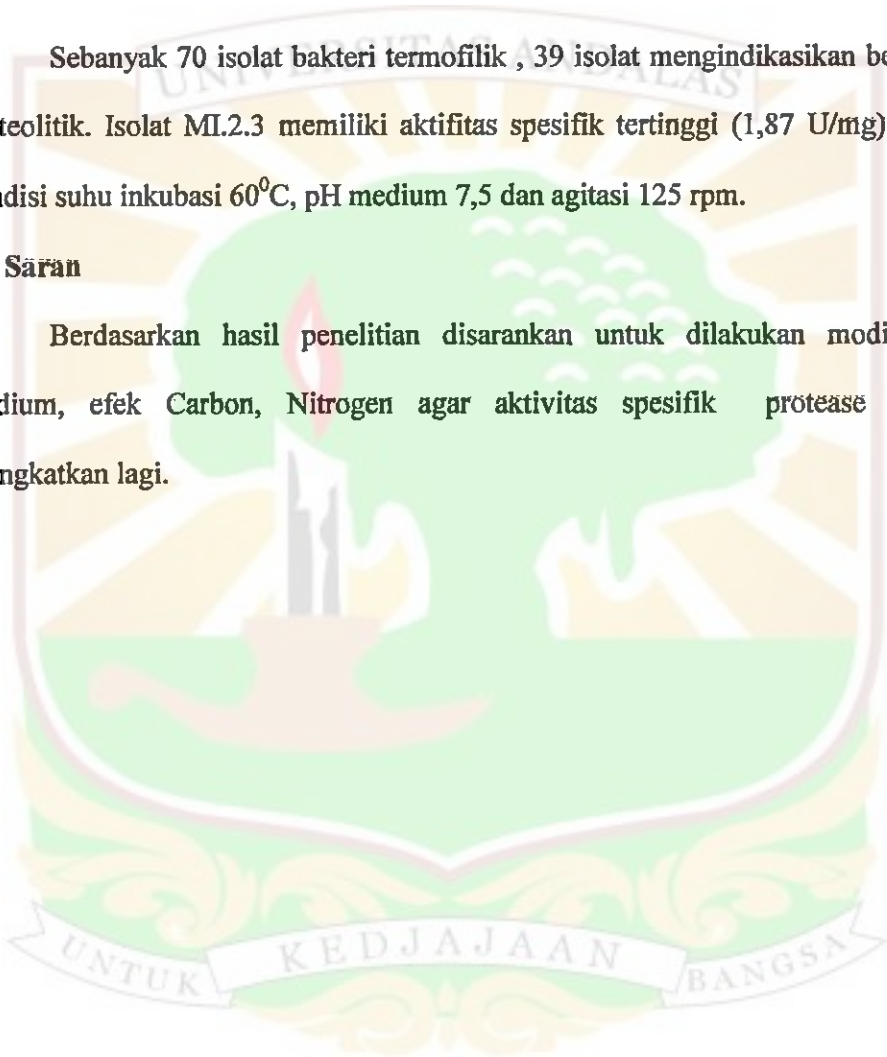
### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

Sebanyak 70 isolat bakteri termofilik , 39 isolat mengindikasikan bersifat proteolitik. Isolat MI.2.3 memiliki aktifitas spesifik tertinggi (1,87 U/mg) pada kondisi suhu inkubasi 60<sup>0</sup>C, pH medium 7,5 dan agitasi 125 rpm.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian disarankan untuk dilakukan modifikasi medium, efek Carbon, Nitrogen agar aktivitas spesifik protease dapat ditingkatkan lagi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A. 2010a. *Isolasi, Optimasi dan Amobilisasi Brevibacillus agri A-03 dari Sumber Air Panas Sumatera Barat Penghasil Protease Alkali dan Keratinase Termostabil Serta Aplikasinya*. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung.
- Agustien, A. 2010b. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS.
- Agustien, A. Dan Rilda, Y. 2011. *Produksi Keratinase Termostabil dari Bacillus licheniformis KA-08 Amobil dan Aplikasinya untuk Bahan Penyamak Kulit*. Luaran Hasil Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Andalas Padang.
- Akhdiya, A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil*. *Buletin Plasma Nutfah vol.9* no.2 TH.2003
- Atlas, R. M. And M. Ronald, 1997. *Principle of Microbiology*. 2<sup>nd</sup> edition, WBC, Mc. Graw-Hill Book, New york.
- Baker, G. C., S. Gaffar, D. A. Cowan, A. R. Suharto. 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *Fems Microbiology letters*, **200**, 103-109.
- Barata, S. 2010. Air Sungai Medang . <http://wisatakabkerinci.blogspot.com>. 05 Maret 2012
- Banerjee, U.C., R.K. Sani, W. Azmi dan R. Soni. 1999. Thermostable alkaline proteases from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, **35**. 213-219.
- Brock, T. D. 1986. Introduction : *An overview of the Thermophiles*, in : *Thermophiles : General, Molecular and applied Microbiology* Ed. T. D. Brock, A wiley inter science publication, john Whilley and sons, New york.
- Cowan, D. A. 1992. *Biochemistry and Molecular Biology of the Extremely Thermophilic Archaeobacteria*, in : *Molecular Biology and Biotechnology Extremophiles*. Ed. R.A. Herbert and R.J. Sharp, Blackie and Sons. New York.
- Crüeger, W. And A. Crüeger. 1984. *A text Book of Industrial Microbiology*. Ed. T. D. Brock, Sinauer Associates Inc. New York.

- Dirnawan, H., A. Suwanto, T. Purwadaria. 2000. Eksplorasi bakteri termofilik penghasil enzim hidrolitik ekstraseluler dari sumber air panas Gunung Pancar. *Hayati*, 7, 2, 52-55.
- Edwards, C. 1990. *Thermophiles in : Microbiology of extreme environments*. Graw-Hill Publ. Company. New york.
- El-Refai, H.A., M. A. Abdelnaby, A. Gabala, M.H. El-Araby and A.F.A Fattah. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40, 2325-2332.
- Fardiaz, S. 1987. *Fisiologi Fermentasi*. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bögör.
- Fitri. K. 2011. *Isolasi & Karakterisasi Parsial Bacillus sp Termo-Alkalifilik Proteolitik Asal Sumber Air Panas Semurup, Jambi*. Skripsi Sarjana Biologi. Universitas & alas. Pa&g
- Fuad, A.M., R. Rahmawati., N.R. Mubarik. 2004. Produksi dan karakterisasi parsial *Bacillus thermoglucosidarius* AF-01. *Jurnal Mikrobiologi Indoneia*, 9, 1, 29-35
- Gläzer, A.N. and H. Nikaido. 1995. *Microbial enzyme in : Microbial Technology, Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company. New York.
- Gomes, J. And W. Steiner. 2004. The Biocatalytic of extremophiles and extremozymes. *Food technology Biotechnology*, 42, 4, 223-235.
- Häki, G.D. and S.K. Rakshit. 2003. Developments in industrially important thermostable enzyme : a review. *Journal Bioresource Technology*, 89. 17-34.
- Indrajaya, F. M. Warganegara and Akhmaloka. 2003. Isolation and identification of thermophilic microorganism from wayang crater. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 8, 53-56.
- Jöhivesly, B and G.R. Naik. 2001. Study on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* JB99 in a chemically defined medium. *Journal process Biochemistry*, 37, 139-144.
- Kim, K. J., Y. J. Yang and J. G. Kim. 2003. Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces sp.* M-20. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 36, 2, 185-189.
- ümar, C. G. And H. Takagi. 1999. Microbial Alkaline proteases from bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advance*, 17, 561-594

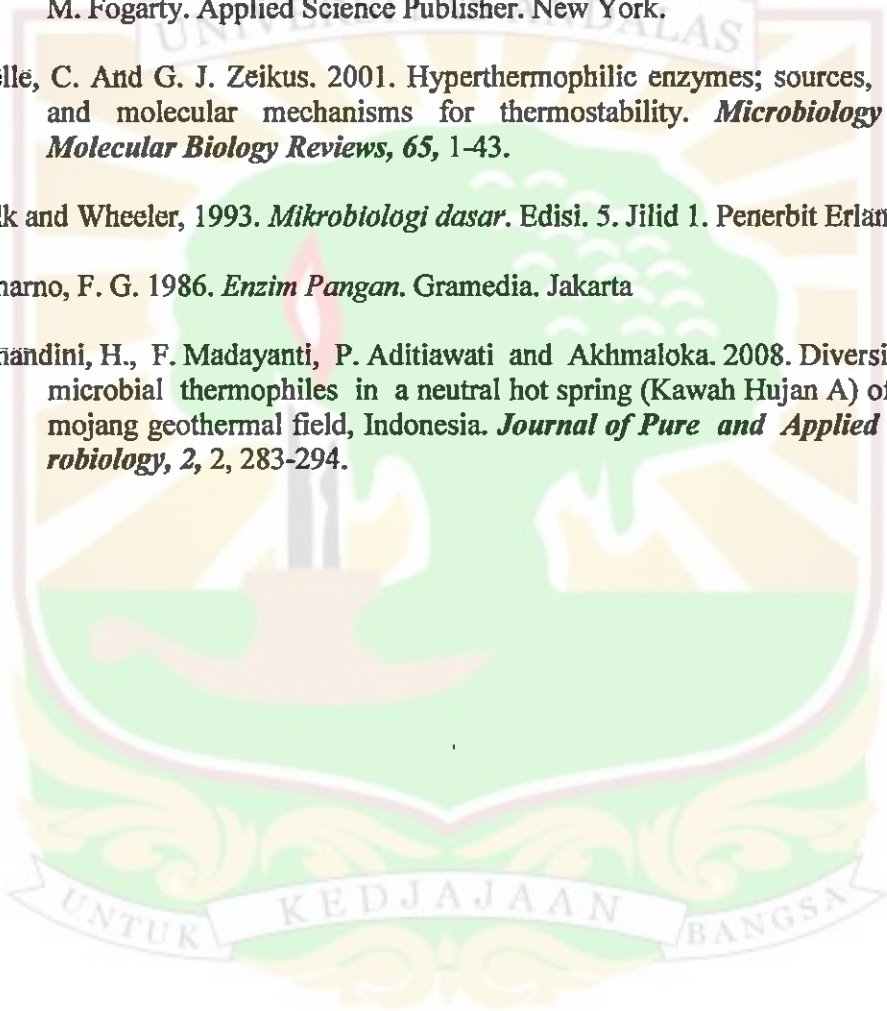
- Kumar, S. And R. Nussinov. 2001. How do Thermophilic protein deals with heat ? A review. *Cell molecular life science*, **58**, 1216-1233.
- Madigan, M.T., J. M. Martinko and J. Parker. 2000. *Biology of microorganisms*. 9th Ed. Prentice Hall International, Inc., New Jersey.
- Mubarik, N.R., 2001. *Pemurnian dan Karakterisasi Protease ekstraseluler dari isolat bakteri termofilik GP-04*. Disertasi. IPB. Bogor.
- Muharni, 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains*, **9**: 12-15
- Moat, G.A and Foster, W, J . 1995. *Microbial Physiology*. Marshall University School of Medicine Huntington, West Virginia.
- Naiola, E. Dan N. Widhyastuti. 2007. Semipurifikasi dan Karakterisasi Enzimi Protease *Bacillus sp*. *Berkala Penelitian Hayati*, **13**, 51-56
- Nascimento, W.C.A and M.L.L. Martins. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp*. *Brazilian Journal*, **38**, 234-240.
- Ningthoujam, D. S. And P. Kshetri. 2010. A thermostable Alkaline Protease from a Moderately Halo-alkalithermotolerant *Bacillus subtilis* Strain SH1. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **4**(10) : 5126-5134
- Olajuyigbe, F.M. dan J.O., Ajele. 2005. Production dynamic of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal Biotechnology*, **4**, 8, 776-779.
- Pakpahan, R. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktifitas protease Termofilik Dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara*. Tesis Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara Medan.
- Prayitno, N.R., Ardiansyah, Rohmatussolihat, Anindyawati, Suryaningrum. 2009. Perencanaan Produk/ Proses Produksi (T.U.01.6401) C : Pengembangan Proses Mikrobial produksi biokatalis terpilih (enzim protease alkalin termostabil dan amilase). 7841
- Purwadaria, T., A. Suwanto., H. Dirnawan. 2000. *Eksplorasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler dari Sumber Air Panas Gunung Pancar*, *Jurnal Hayati*, **7**, No. 2. hlm 52-55
- Purwani, E. Y., A. Toharisman., E. Chasanah., J. F. Laksmi., V. Welan., M. T. Suhartono., T. Purwadaria., J. K. Hwang dan Y. R. Pyun. 2002. Studi



Pendahuluan Enzim Kitinase Ekstraseluler yang dihasilkan oleh Isolat Bakteri Asal Manado. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 13, No. 2.

- Rahayu, S. 2004. *Karakteristik Biokimiawi Enzim Termotabil Penghidrolisis Kitin*. Makalah Pengantar Falsafah Sains. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Rao, C.H.S., S.S. Madhavendra, R. R. Sreenivas, P. J. Hobbs and R.S. Prakasham. 2008. Studies on improving the immobilized bead reusability and alkaline protease production by isolated immobilized *Bacillus circulans* (MTCC6811) using overall evaluation criteria. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 150, 1, 65-83
- Reka, N. 2002. *Aktivitas Dan Karakterisasi Enzim Protease dari Bacillus sp 1 dan Bacillus sp 2 Isolat Dari Sumber Air Panas Rimbo Panti*. Skripsi Sarjana Biologi. Universitas Andalas. Padang.
- Satiawihardja, B., M. T. Suhartono., A. Kusdinar, 1997. Mempelajari Pengaruh Lingkungan Kimiawi Terhadap Aktifitas dan Daya Tahan Panas protease dari *Bacillus pumilus* Y1. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, 8, No.2.
- Shafee, N., S.N. Aris, R.N.Z.A. Rahman, M. Basri and A.B. Saleh., 2005. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strains 146. *Journal Applied Sciences Research*. 1, 1, 1-8.
- Singleton, P. 2004. *Bacteria : In Biology, Biotechnology and Medicine*. The Quarterly review of Biology. 6<sup>th</sup> Ed. Willey and Sons. New York.
- Stanbury, P.F. and A. Whitaker. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press, Oxford.
- Sugiyono, A. J. Lintang, R. A. Sabe. 2003. Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah.
- Suhartono, M. T. 1991. *Protease*, PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Sumantha, A., C. Larroche, and A. Pandey. 2006. Microbiology and industrial of food-grade protease : A perspective. *Food Technology, Biotechnology*, 44, 2, 211-220.
- Suntornsuk, W. and Suntornsuk, L.F 2003. Feather degradation by *Bacillus sp.* FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*, 86, 3, 239-243.

- Susanti, E. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Biodiversitas*, **4**, 12-17
- Trivedi, S., H. S. Gehler and S.R. Rao. 2006. Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genetics and Molecular Research*. **5**, 4, 816-827.
- Wahyuntari, B. 2001. *Pemurnian dan karakterisasi protease ekstraseluler isolat prokariot termofilik ekstrim dari tangkuban perahu*. Disertasi, IPB, Bogor.
- Ward, O.P. 1983. *Proteinase*. Di dalam *Microbial Enzyme and Biotechnology*. W. M. Fogarty. Applied Science Publisher. New York.
- Vielle, C. And G. J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes; sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**, 1-43.
- Volk and Wheeler, 1993. *Mikrobiologi dasar*. Edisi. 5. Jilid 1. Penerbit Erlangga.
- Winarno, F. G. 1986. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta
- Yohandini, H., F. Madayanti, P. Aditiawati and Akhmaloka. 2008. Diversity of microbial thermophiles in a neutral hot spring (Kawah Hujan A) of Kamojang geothermal field, Indonesia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **2**, 2, 283-294.



## LAMPIRAN 1. Komposisi medium yang digunakan dalam penelitian

### A. Medium Nutrien Agar (NA)

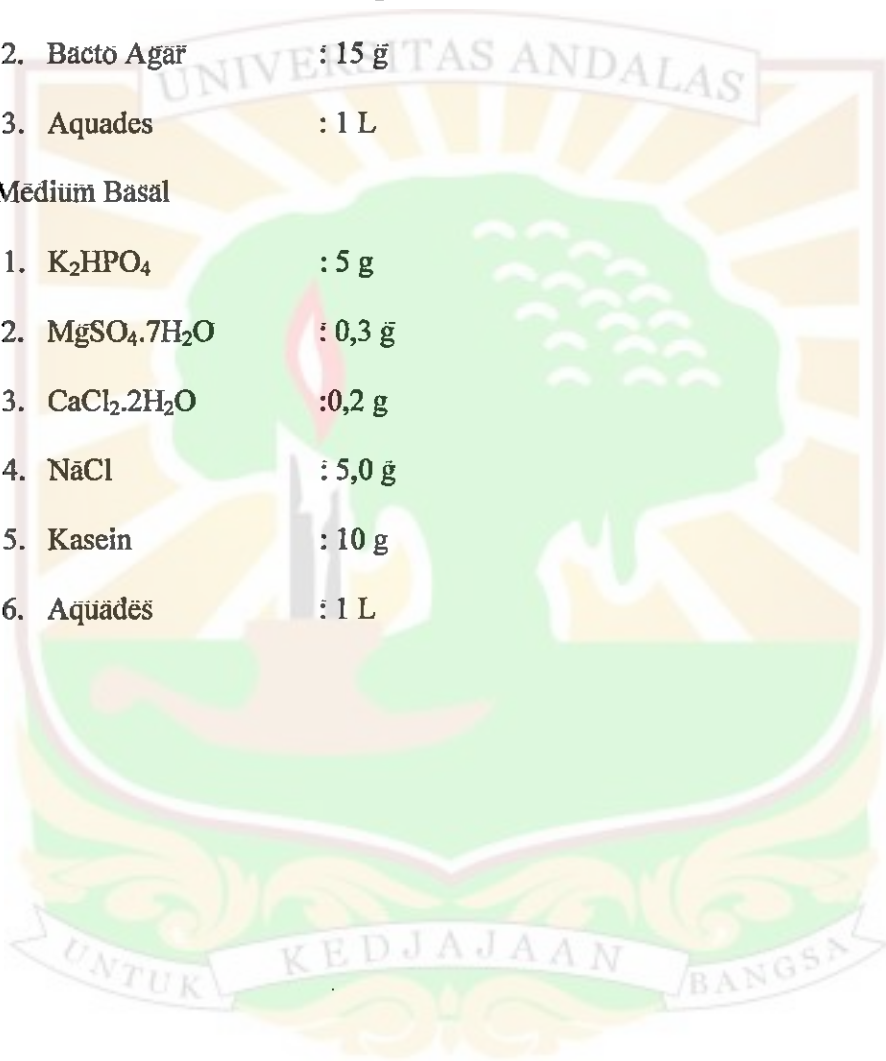
1. NA Powder : 23 g
2. Aquades : 1 L

### B. Medium Skim Milk Agar (SMA)

1. Susu Skim : 20 g
2. Bacto Agar : 15 g
3. Aquades : 1 L

### C. Medium Basal

1.  $K_2HPO_4$  : 5 g
2.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  : 0,3 g
3.  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  : 0,2 g
4. NaCl : 5,0 g
5. Kasein : 10 g
6. Aquades : 1 L



## LAMPIRAN 2. Pembuatan pereaksi yang digunakan dalam penelitian

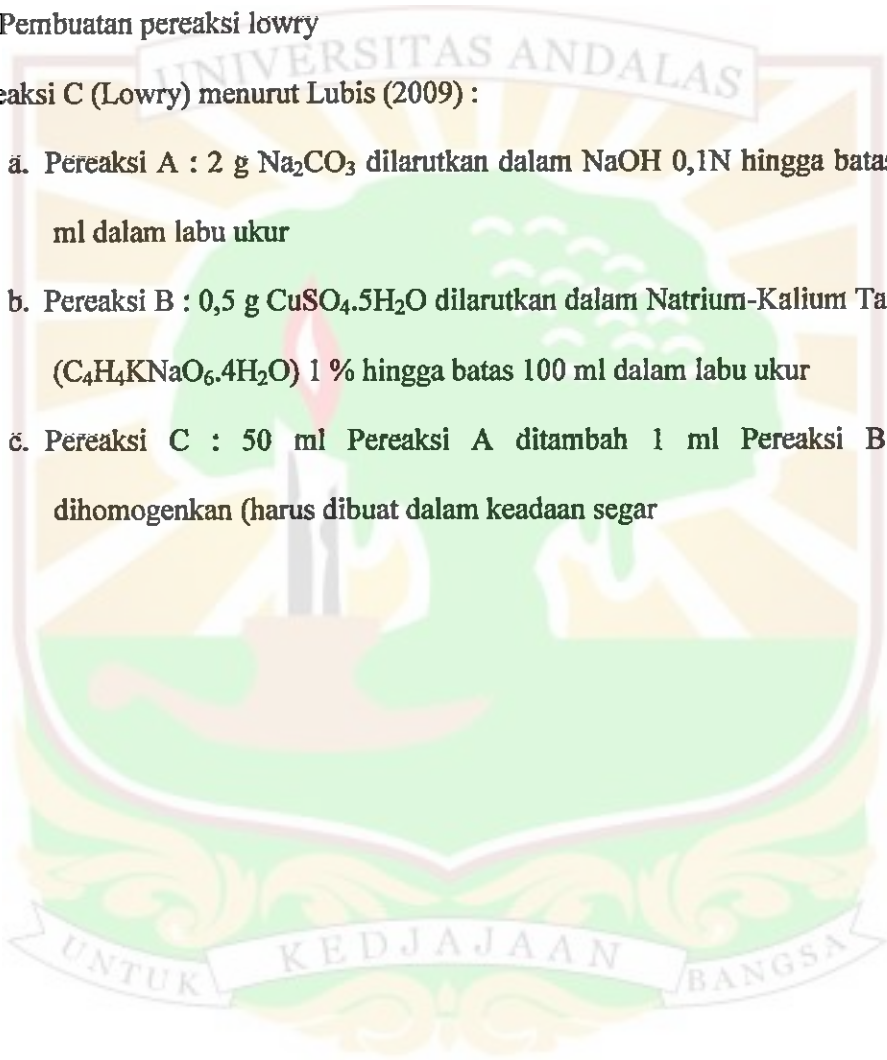
### 2.1 Pembuatan Pereaksi folin ciocalteu 1 N

Pereaksi folin ciocalteu's 1 N menurut Lubis (2009) : (reagen folin ciocalteu's 2 N diencerkan dengan aquades dengan perbandingan 1 : 1 v/v).

### 2.2 Pembuatan pereaksi lowry

Pereaksi C (Lowry) menurut Lubis (2009) :

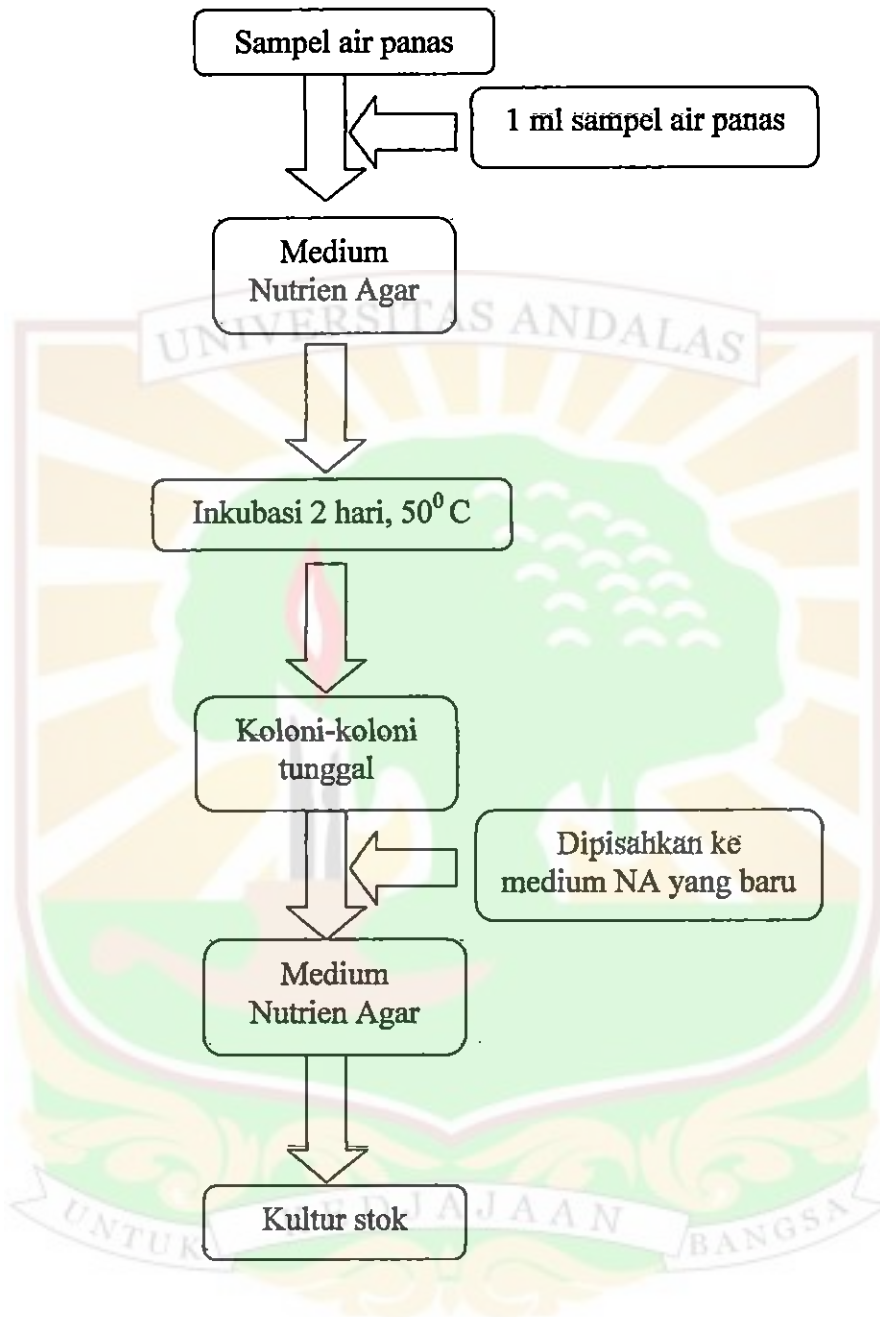
- a. Pereaksi A : 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam NaOH 0,1N hingga batas 100 ml dalam labu ukur
- b. Pereaksi B : 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam Natrium-Kalium Tartarat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 1 % hingga batas 100 ml dalam labu ukur
- c. Pereaksi C : 50 ml Pereaksi A ditambah 1 ml Pereaksi B dan dihomogenkan (harus dibuat dalam keadaan segar)



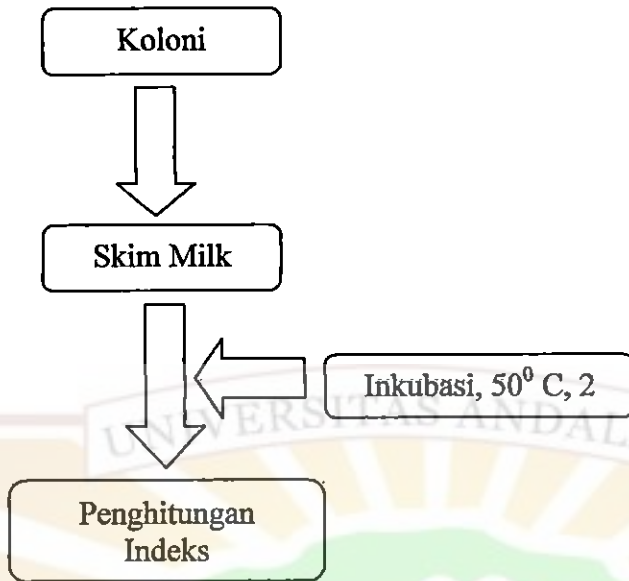


LAMPIRANAN 3. Alur kerja isolasi dan penapisan bakteri termo-proteolitik

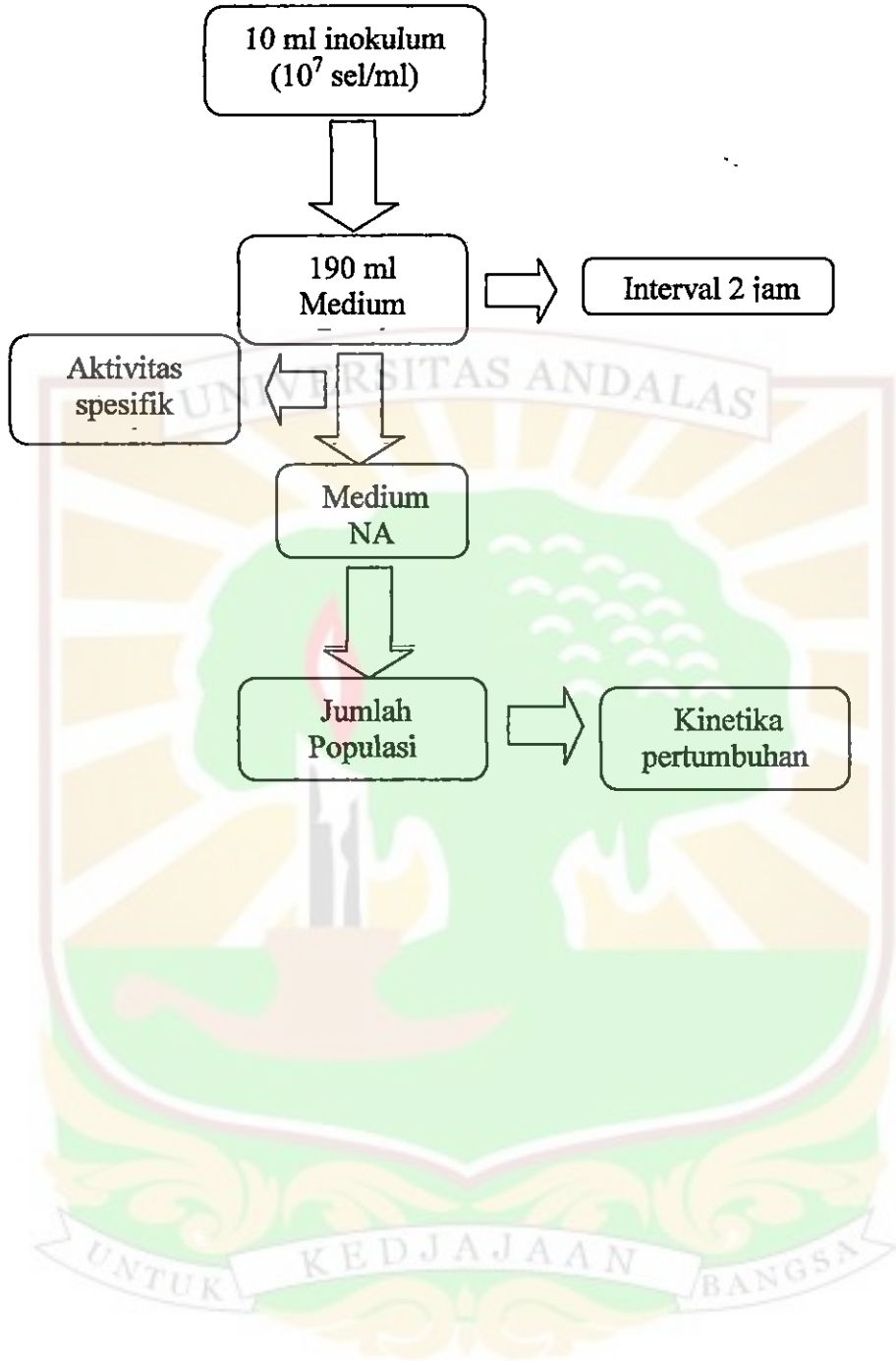
1. Isolasi Bakteri Termofilik



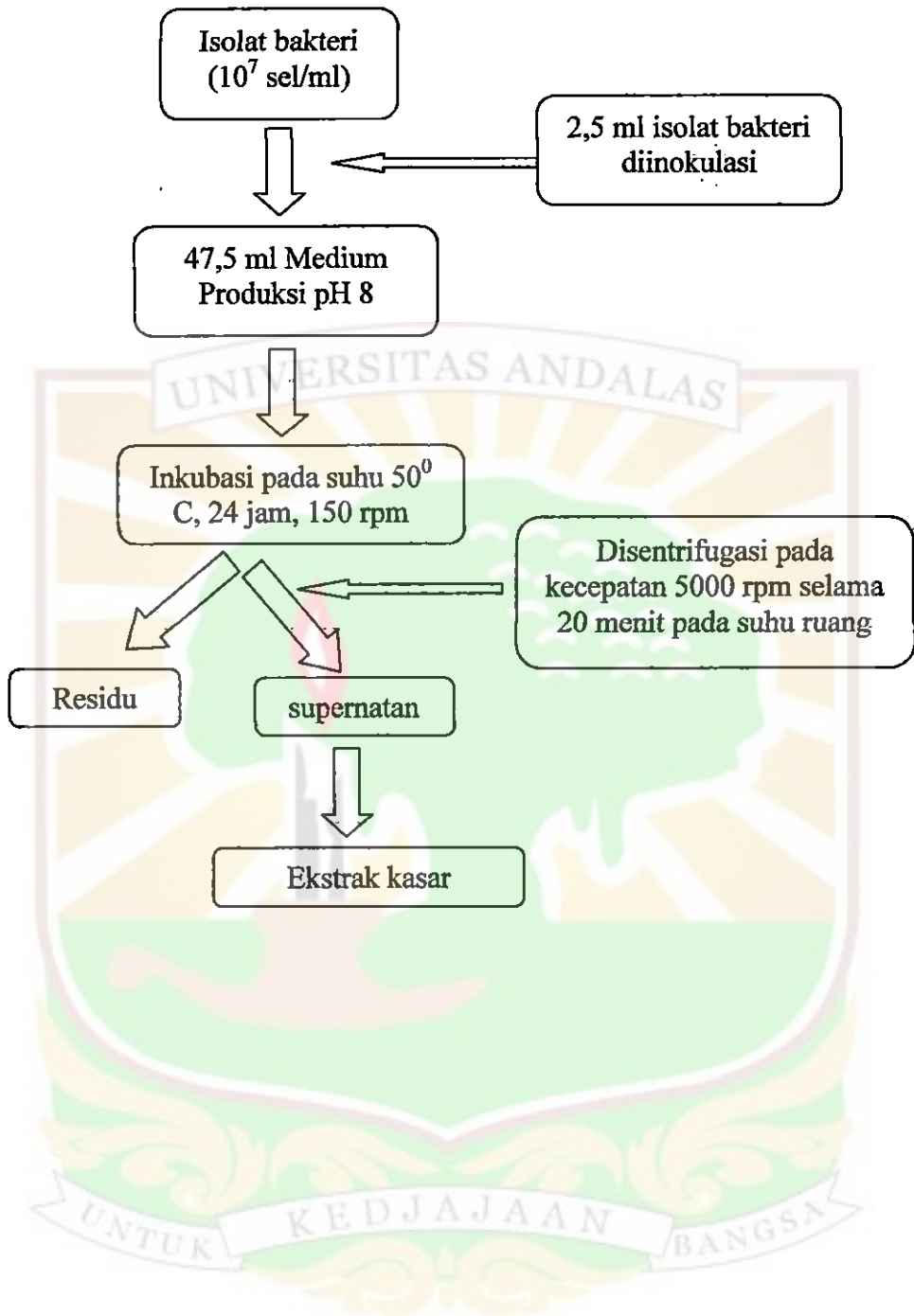
# 1. Penapisan bakteri termo-proteolitik



LAMPIRAN 5. Alur pembuatan profil kurva pertumbuhan bakteri termo-prôteolitik

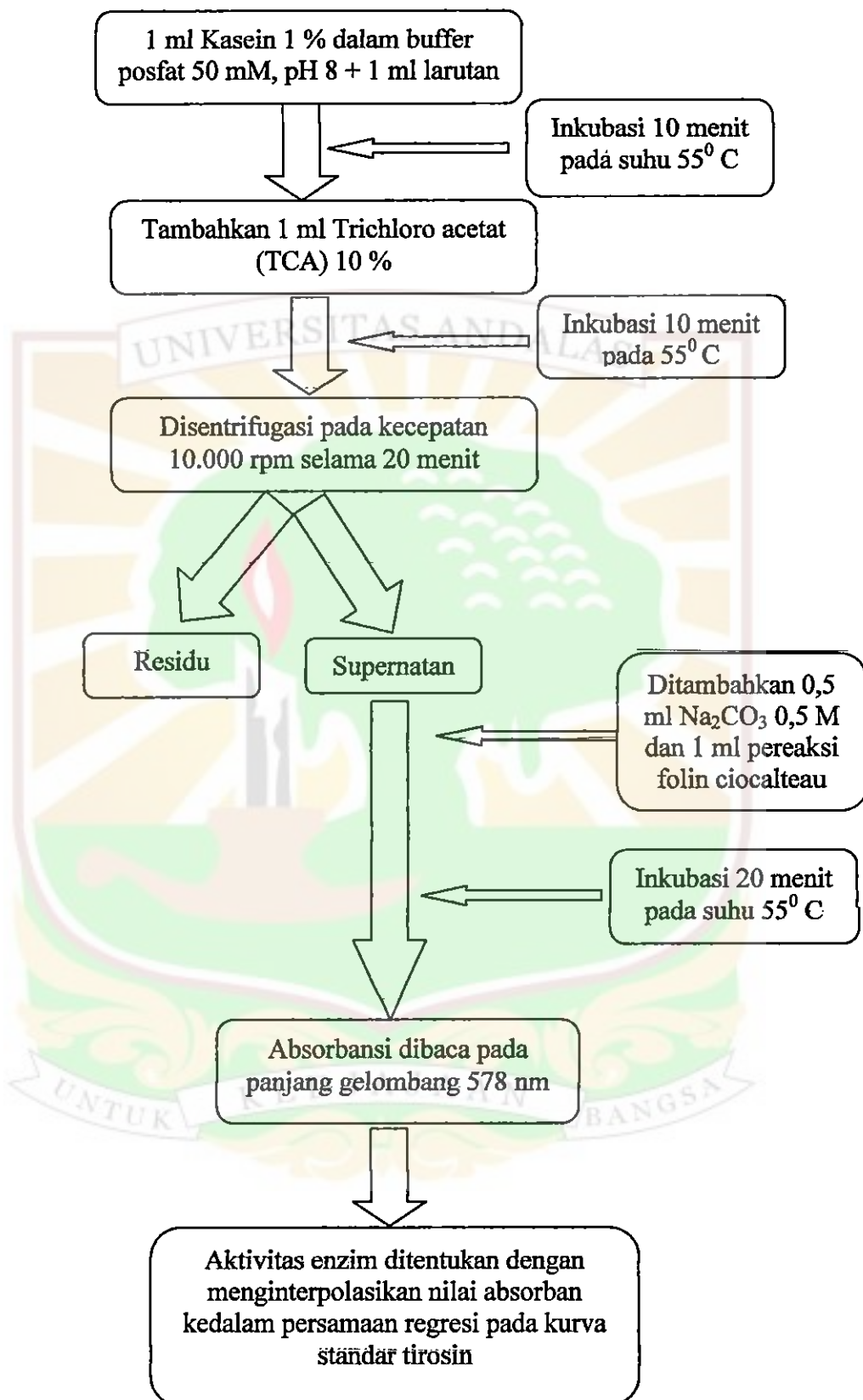


LAMPIRAN 6. Alur kerja isolasi enzim protease

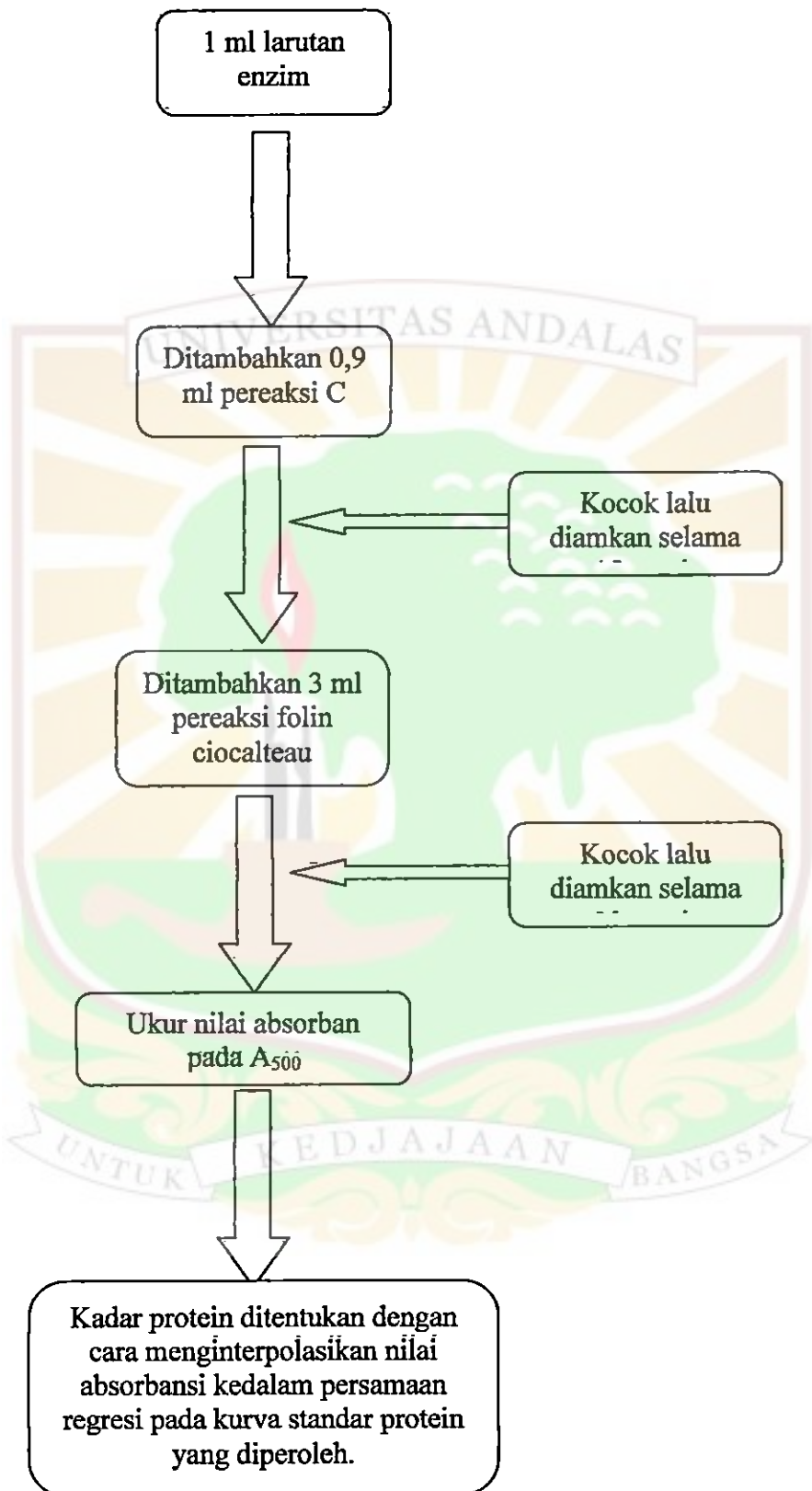




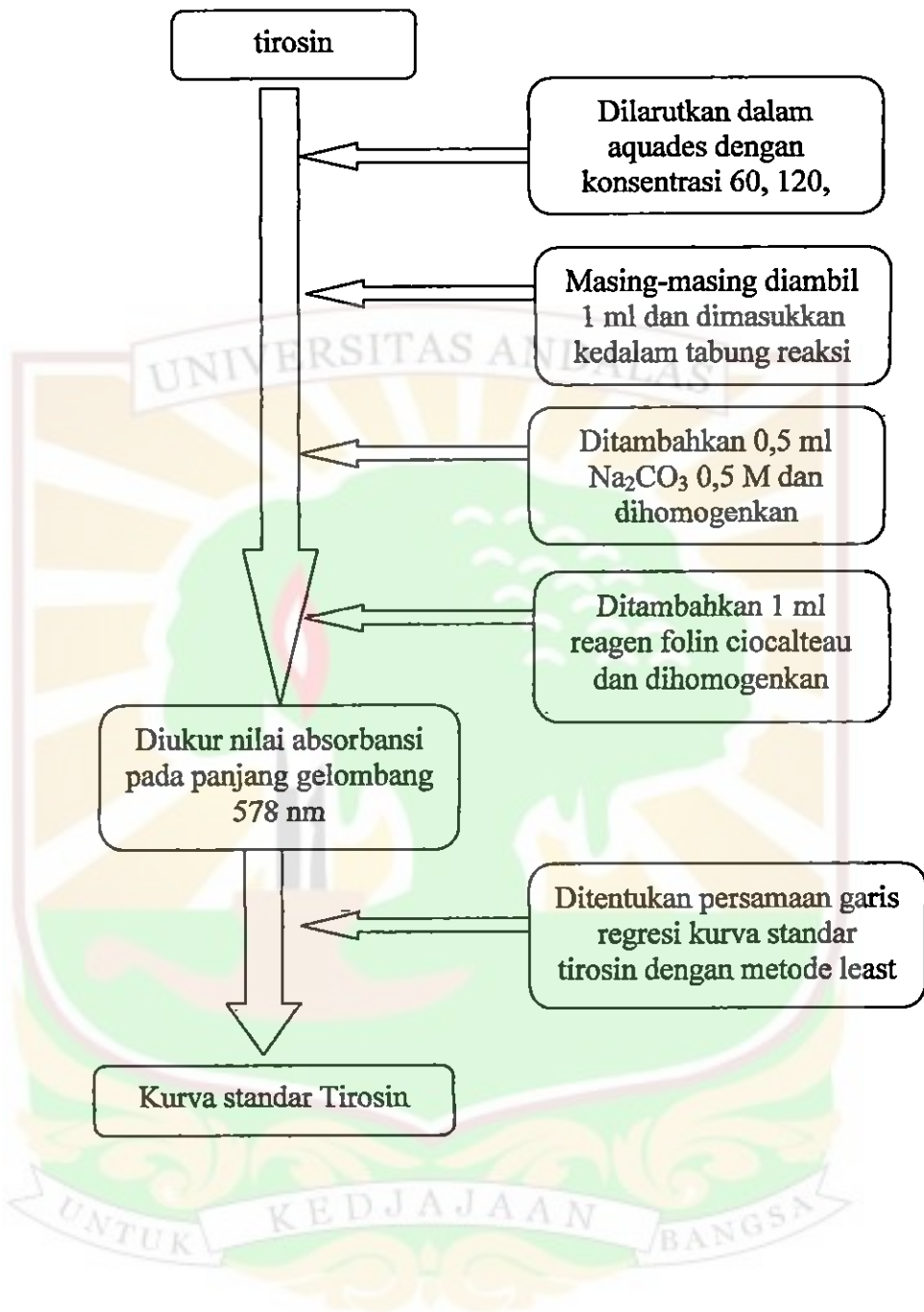
LAMPIRAN 7. Alur Kerja Uji aktivitas protease dengan metode Ward (1984)



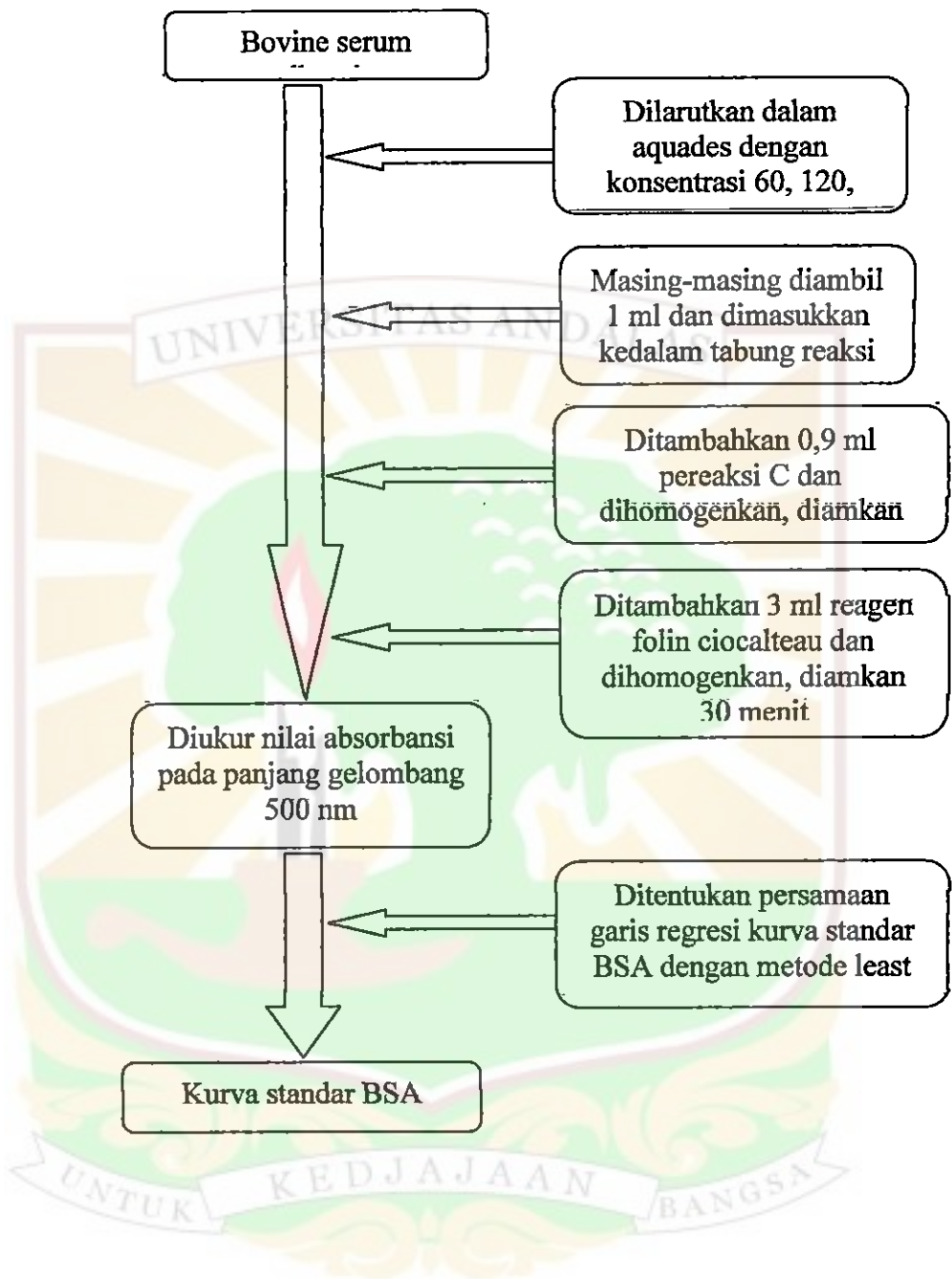
LAMPIRAN 8. Alur Kerja Penentuan Kadar Protein Enzim Protease dengan Metode Lowry (1976)



LAMPIRAN 9. Alur kerja pembuatan kurva standar Tirosin



LAMPIRAN 10. Alur kerja pembuatan kurva standar BSA





Lampiran 11. Foto-foto pengamatan sifat fisika air panas Sungai Medang Kabupaten

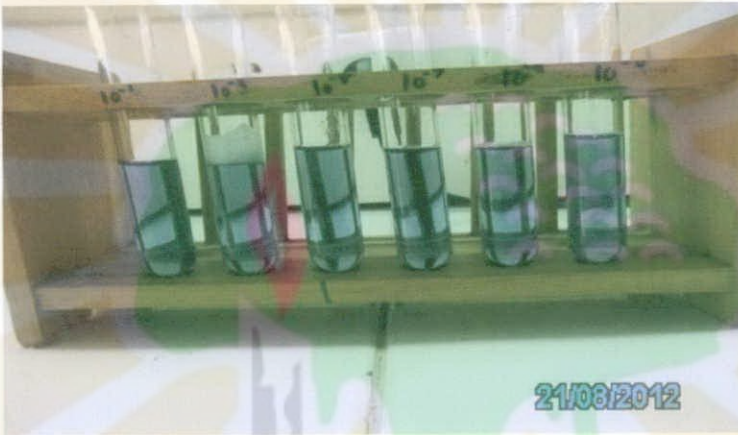
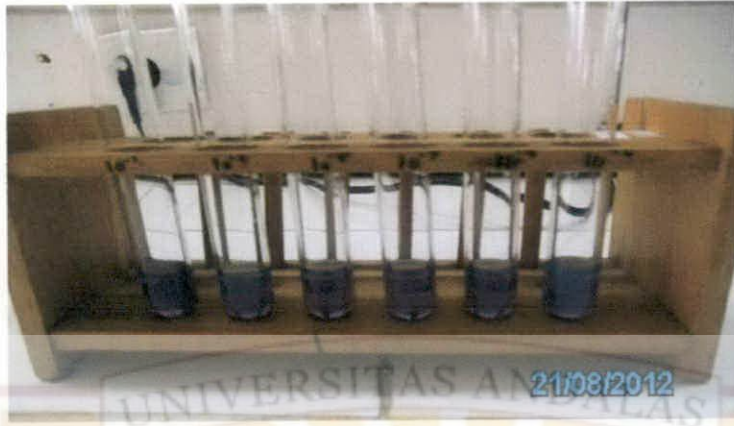
Kerinci. Jambi







Lampiran 13. Foto-foto Uji aktivitas enzim protease



LAMPIRAN 14. Lokasi pengambilan sampel



**Kolam I.**



**Kolam II.**







**Kolam III.**



**Kolam IV.**

