

**PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE
DARI ISOLAT *Bacillus* sp. EK A19 DARI USUS KECOA
(*Pycnoscelus surinamensis*)**

SKRIPSI



ABIMA SETYA RAMADHANA

**PROGRAM STUDI S1 BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

**PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE
DARI ISOLAT *Bacillus* sp. EK A19 DARI USUS KECOA
(*Pycnoscelus surinamensis*)**

SKRIPSI



ABIMA SETYA RAMADHANA

**PROGRAM STUDI S1 BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI ISOLAT
***Bacillus* sp. EK A19 DARI USUS KECO A (*Pyrenoscetus surinamensis*)**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Biologi
Pada Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Abima Setya Ramadhana

081811433070

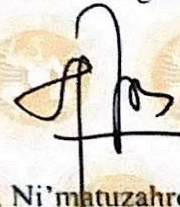
Disetujui oleh:

Pembimbing I



Drs. Agus Surpiyanto, M.Kes.
NIP. 196208241989031002

Pembimbing 2



Dr. Ni'matuzahroh
NIP. 196801051992032003

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Purifikasi Dan Karakterisasi Enzim Protease dari Isoiat
Bacillus sp. EK A19 dari Usus Kecoa (*Pycnoscelus*
Surinamensis)

Penyusun : Abima Setya Ramadhana

NIM : 081811433070

Pembimbing I : Drs. Agus Supriyanto, M.Kes.

Pembimbing II : Dr. Ni'matuzahroh

Tanggal Seminar : 8 Agustus 2022

Disetujui Oleh

Pembimbing I

Pembimbing II



Drs. Agus Supriyanto, M.Kes.

NIP.196208241989031002



Dr. Ni'matuzahroh

NIP.196801051992032003

Mengetahui,

Ketua Departemen Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.

NIP. 196602211992032001

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. **Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga**

SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINILITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Abima Setya Ramadhana

NIM : 081811433070

Program Studi : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Universitas : Airlangga

Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan, bahwa saya tidak melakukan plagiasi dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI ISOLAT *Bacillus* sp. EK A19 DARI USUS KECOYA (*Pycnoscelus surinamensis*)

Apabila di kemudian hari terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 11 Agustus 2022



Abima Setya Ramadhana
NIM.081811433070

Abima Setya Ramadhana, 2018, **Purifikasi Dan Karakterisasi Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* Sp. EK A19 Dari Usus Kecoa (*Pycnoscelus Surinamensis*)**. Skripsi ini di bawah bimbingan Drs. Agus Supriyanto, M.Kes., Dr Ni'matuzahroh., Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk purifikasi dan karakterisasi enzim protease yang didapatkan dari isolate *Bacillus* sp. EK A19 dari usus kecoa (*Pycnoscelus Surinamensis*). Enzim protease diproduksi menggunakan media Bushnell Haas Broth dengan *inducer* kasein (5% v/v) dan dishaker selama 3 hari. Kultur hasil produksi enzim disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm, 30 menit, dengan suhu 4 °C. *Crude* enzim protease yang didapatkan, dipurifikasi dengan metode presipitasi amonium sulfat dengan berbagai fraksi (F0 0-20%, F1 20-40%, F2 40-60% dan F3 60-80%). Enzim protease juga dikarakterisasi dengan melihat aktivitas enzim pada berbagai Suhu (20 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C) yang dilanjutkan dengan berbagai pH (4, 5, 6, 7, 8) dan ion logam (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}). Enzim protease yang dipurifikasi, memiliki tingkat kemurnian paling tinggi 2,4 *fold* pada F3 60-80%. Enzim protease memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 37 °C dengan nilai 0,031 U/mL. Dari berbagai pH yang diujikan, enzim protease memiliki aktivitas tertinggi pada pH 8 dengan nilai 0,031 U/mL. Dari berbagai penambahan ion logam, hanya ion Ca^{2+} yang meningkatkan nilai aktivitas enzim protease sedangkan ion logam lainnya menurunkan nilai aktivitas enzim protease.

Kata kunci : protease, *Bacillus* sp. EK A19, purifikasi, karakterisasi, tingkat kemurnian, aktivitas enzim.

Abima Setya Ramadhana, 2018, **Purification and Characterization of Protease Enzyme From *Bacillus* sp. EK A19 Isolated From The Intestine Of a Cockroach (*Pycnoscelus surinamensis*)**. This script is guided by Drs. Agus Supriyanto, M.Kes., Dr. Ni'matuzahroh., Biology Departement, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya

ABSTRACT

This study aims to purify and characterization protease enzymes obtained from *Bacillus* sp. EK A19 isolated from the intestine of a cockroach (*Pycnoscelus surinamensis*). The protease enzyme was produced using Bushnell-Haas Broth media with a casein inducer (5% v/v) and shaken for 3 days. The culture produced by the enzyme was centrifuged at a speed of 3500 rpm, 30 minutes, at a temperature of 4 °C. The crude protease enzyme obtained was purified by the ammonium sulfate precipitation method with various fractions (F0 0-20%, F1 20-40%, F2 40-60% and F3 60-80%). Protease enzymes were also characterized by observing the enzyme activity at various temperatures (20 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C) followed by various pH (4, 5, 6, 7, 8) and metal ions (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}). The purified protease enzyme has the highest level of purity 2,4 fold at F3 60-80% . The protease enzyme had the highest activity at 37 °C with a value of 0.031 U/mL. The protease enzyme had the highest activity at pH 8 with a value of 0.031 U/mL. On the various additions of metal ions, only Ca^{2+} ions increased the activity value of the protease enzyme while other metal ions decreased the activity value of the protease enzyme.

Keywords : Protease, *Bacillus* sp. EK A19, purify, characterize, purity level, enzyme activity.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah Subhanahu Wata'ala karena atas rahmat, hidayah, dan karunia-Nya kepada penyusun sehingga penyusunan Skripsi yang berjudul “**Purifikasi Dan Karakterisasi Enzim Protease Dari Isolat *Bacillus sp. EK A19* Dari Usus Kecoa (*Pycnoscelus surinamensis*)**” dapat diselesaikan dengan baik. Penulis menyusun naskah ini demi syarat kelulusan untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) dan mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si) program studi S-1 Biologi Universitas Airlangga.

Naskah penelitian ini adalah bagian dari penelitian utama yang mempunyai judul DIVERSITAS MIKROBA ASOSIATIF PADA SALURAN CERNA HEWAN DEKOMPOSER SAMPAH DOMESTIK : UPAYA PRODUKSI ENZIM POTENSIAL DAN FORMULA HEWAN DEKOMPOSER DALAM PENGOLAHAN SAMPAH YANG EFEKTIF. Penelitian ini dipimpin oleh Dr. Ni'matuzahroh. Penelitian ini bertujuan untuk mencari enzim dan formula hewan yang hidup pada limbah agar dapat efektif dalam mengelola sampah

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan Skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis sangat terbuka dalam menerima kritik dan saran yang membangun untuk menyempurnakan naskah skripsi ini. Semoga naskah skripsi ini dapat memberikan tambahan informasi dan bermanfaat bagi pembaca guna pengembangan ilmu di kemudian hari.

Surabaya, 19 Juli 2022

Penyusun,



Abima Setya Ramadhana

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penyusun panjatkan kepada Allah Subhanahu Wata'ala, atas berkat rahmat, hidayah, dan karunia-Nya kepada penyusun sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan naskah skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.) kelulusan program studi S1-Biologi Universitas Airlangga. Tidak lupa sholawat serta pujian senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad Shallallahu Alaihi Wasallam dan para sahabat Nabi. Penyusun menyadari bahwa penyusunan naskah skripsi ini tidak lepas dari doa, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini penyusun ingin mengucapkan ucapan terima kasih kepada :

1. Drs, Agus Supriyanto, M.Kes., sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan ilmu, waktu, bimbingan, arahan, dan kesabaran kepada penyusun sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dan tersusun dengan baik.
2. Dr. Ni'matuzahroh, sebagai pembimbing kedua dan dosen pembimbing penelitian yang telah memberikan ilmu, arahan, dan juga kesabaran kepada penyusun sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dan tersusun dengan baik.
3. Dr. Salamun, M.Kes. selaku dosen penguji tiga yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan skripsi.
4. Intan Ayu Pratiwi, S.Si., M.Si. selaku penguji empat yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan skripsi.
5. Prof. Dr. Moh. Yasin, M.Si. selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
6. Prof. Dr. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si. selaku kepala Departemen Biologi serta ketua program studi S-1 Biologi Universitas Airlangga.
7. Seluruh dosen Fakultas Sains dan Teknologi yang telah mendidik dan memberi ilmu selama perkuliahan, sehingga penyusun dapat menjadi seperti sekarang.
8. Seluruh Laboran Program Studi Biologi, Universitas Airlangga yang telah membantu dan membimbing dalam menjalankan penelitian skripsi peneliti.

9. Mama Wiwik, Papa Trisetyo, dan adik Aura yang telah mendo'akan dan membantu menyusun secara mental dan finansial selama masa perkuliahan.
10. Marsa Mandiri Mulya yang telah membantu dan menemani selama penelitian.
11. Mbak Silvi dan Mbak Ana yang telah membantu dan memberikan masukan selama penelitian.
12. Mahdi Izzudin yang telah menemani selama penyusunan proposal hingga penyusunan skripsi.
13. Geng Temenan Tatag Bio, Haikal, Hafiz, Melvin, Fani, Dimas, Angga dan teman-teman biologi 2018 yang selalu memberikan semangat dan saling menghibur.
14. Tim proyek PDUPT, Meda, Ayu, Cindy, Nia, Sholikhah, yang telah bekerja sama untuk menyelesaikan penelitian dan saling membantu.
15. Semua pihak yang telah membantu yang tidak bisa disebutkan satu per-satu.

DAFTAR ISI

	halaman
LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI.....	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINILITAS	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
KATA PENGANTAR	viii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Asumsi	4
1.5 Hipotesis.....	5
1.6 Manfaat Penelitian	5
BAB II.....	7
TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Enzim Protease.....	7
2.1.1 Sumber enzim protease	7
2.1.2 Klasifikasi enzim protease	7
2.1.3 Substrat enzim protease.....	8
2.1.4 Aplikasi enzim protease	9
2.2 Bakteri	10
2.2.1 Bakteri pada usus <i>Pycnoscelus surinamensis</i>	11

2.2.2 Bakteri Proteolitik	13
2.2.3 Klasifikasi dan karakter <i>Bacillus</i> sp. EK A19.....	13
2.3 Purifikasi Enzim.....	14
2.3.1 Sentrifugasi	15
2.3.2 Presipitasi dengan amonium sulfat.....	15
2.4 Aktivitas Enzim.....	16
2.5 Kadar Protein	16
2.6 Aktivitas Spesifik Enzim	17
2.7 Nilai Purifikasi	17
2.8 Karakterisasi Enzim Protease.....	17
2.8.1 Suhu optimum enzim Protease.....	18
2.8.2 pH optimum enzim Protease	18
2.8.3 Ion logam terhadap enzim protease	18
BAB III	19
METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.2.1 Alat.....	19
3.2.2 Bahan	19
3.3 Rancangan Penelitian	19
3.4 Variabel Penelitian	20
3.5 Tahap Penelitian.....	20
3.5.1 Pembuatan media dan reagen.....	20
3.5.2 Uji validasi kemurnian isolat bakteri <i>Bacillus</i> sp. EK A19	23
3.5.3 Peremajaan bakteri	24
3.5.4 Produksi enzim protease <i>Bacillus</i> sp. EK A19.....	24
3.5.5 Uji aktivitas enzim	25
3.5.6 Analisis dan uji kadar protein	26
3.5.7 Penentuan aktivitas spesifik enzim protease	27
3.5.8 Pemurnian enzim protease presipitasi dengan amonium sulfat	27
3.5.9 Penentuan nilai tingkat purifikasi.....	28
3.5.10 Karakterisasi enzim protease.....	28

3.5.11 Analisis data.....	30
3.6 Kerangka Operasional Penelitian.....	30
BAB IV	32
4.1 Hasil.....	32
4.1.1 Uji kemurnian <i>Bacillus</i> sp. EK A19.....	32
4.1.2 Purifikasi enzim protease	33
4.1.3 Karakterisasi enzim protease pada variasi suhu.....	35
4.1.4 Karakterisasi enzim protease pada variasi pH	36
4.1.5 Karakterisasi enzim protease terhadap ion-ion logam.....	36
4.2 Pembahasan	37
BAB V	41
5.1 Kesimpulan.....	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	(1) mikroskopis <i>Bacillus</i> sp. EK A19, (2) makroskopis <i>Bacillus</i> sp. EK A19	14
Gambar 3.1	Kerangka operasional penelitian	31
Gambar 4.1	A. kultur <i>Bacillus</i> sp. EK A19 pada cawan Petri menggunakan metode <i>quadrant streak</i> ; B. Pewarnaan <i>gram</i> <i>Bacillus</i> sp. EK A19	32
Gambar 4.2	Grafik hasil karakterisasi enzim protease terhadap variasi suhu	36
Gambar 4.3	Karakterisasi enzim protease terhadap variasi pH	36
Gambar 4.4	Karakterisasi enzim protease terhadap ion-ion logam	37

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
Tabel 3.1	Pengenceran larutan standar 100 mg/L tirosin	21
Tabel 3.2	Pengenceran larutan standar 1000 mg/L BSA	22
Tabel 4.1	Tabel hasil analisis <i>crude</i> enzim	34
Tabel 4.2	Hasil fraksi presipitasi amonium sulfat	34
Tabel 4.3	Hasil uji produksi dan purifikasi enzim protease	35

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran	Halaman
Lampiran 1	Tabel kurva standar tirosin	51
Lampiran 2	Grafik kurva standar tirosin	52
Lampiran 3	Tabel kurva standar BSA	52
Lampiran 4	Grafik kurva standar BSA	53
Lampiran 5	Uji <i>crude</i> enzim protease	53
Lampiran 6	Tabel pertumbuhan bakteri dalam kultur produksi enzim protease	54
Lampiran 7	Tabel karakterisasi enzim protease terhadap suhu	54
Lampiran 8	Tabel karakterisasi enzim protease terhadap pH	54
Lampiran 9	Tabel karakterisasi enzim protease terhadap ion logam	55
Lampiran 10	Dokumentasi penelitian	56