

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian tentang skrining dan uji aktivitas enzim protease bakteri hasil isolasi dari limbah Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Pacar Keling Surabaya menghasilkan data-data sebagai berikut :

1. Isolat bakteri penghasil enzim protease yang berasal dari limbah rumah pemotongan hewan Pacar Keling, Surabaya
2. Kemampuan aktivitas kualitatif proteolitik isolat bakteri penghasil enzim protease
3. Kurva pertumbuhan bakteri selama 3 hari dari isolat yang terpilih, dengan waktu pengamatan setiap 4 jam
4. Nilai aktivitas proteolitik dari isolat bakteri yang terpilih, selama 3 hari dengan waktu pengamatan setiap 4 jam

Uraian tentang hasil data-data penelitian tersebut disajikan dan dibahas berturut-turut sebagai berikut.

4.1 Isolasi dan Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Enzim Protease

Bakteri di isolasi dari limbah cair rumah pemotongan hewan Pacar Keling Surabaya. Dilakukan pengujian dengan metode *pour plate* (sebar) pada media Nutrien Agar plate. Kemudian dilakukan pengujian karakter secara makroskopis. Dari uji karakteristik secara makroskopis, didapatkan 12 isolat mikroba (5 bakteri, 7 yeast) dengan karakteristik koloni yang berbeda. Karakter makroskopis dapat diketahui dari bentuk koloni, warna koloni, tepi dan elevasi dari koloni. Dari 12

isolat yang didapat, dilakukan pengujian aktivitas proteolitik secara kualitatif dengan menumbuhkan satu *loopfull* isolat pada permukaan media selektif susu skim agar. Karakter makroskopis dari 12 isolat tersebut disajikan pada Tabel 4.1 di bawah ini.

Tabel 4.1 Karakter makroskopis dua belas isolat bakteri proteolitik dari limbah rumah pemotongan hewan Pacar Keling Surabaya

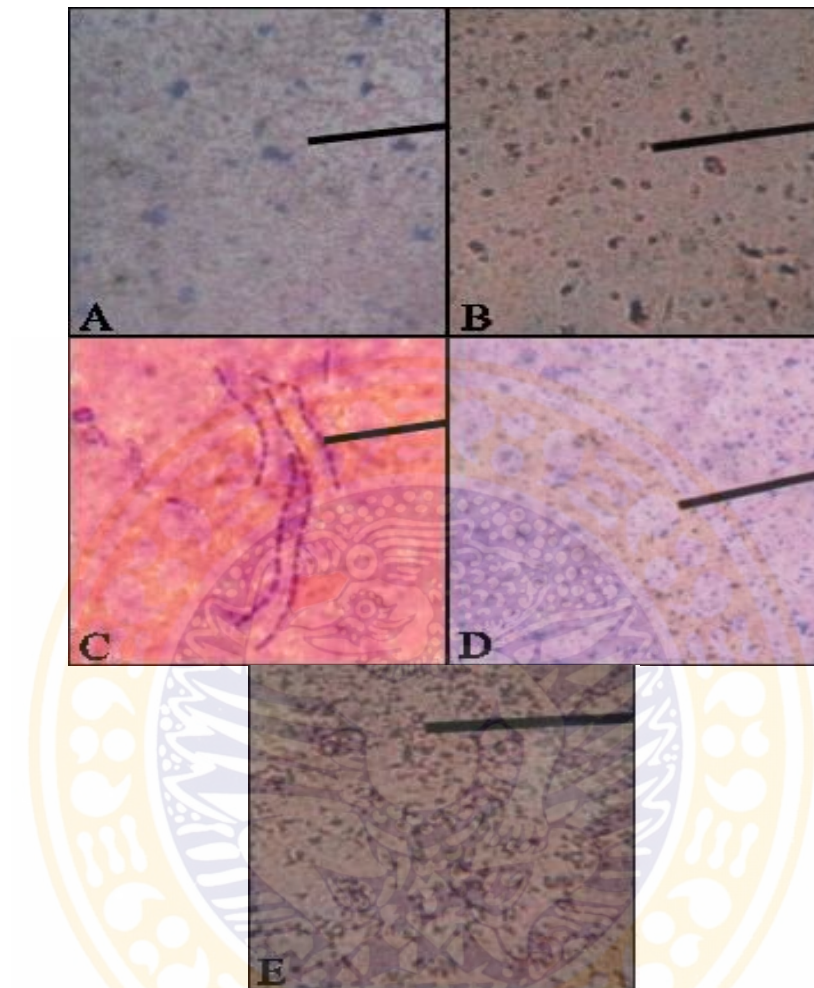
No	Kode Isolat	Karakter Makroskopis			
		Bentuk Koloni	Warna Koloni	Tepi	Elevasi
1	RPH 1.1	Bulat	Putih kusam	Rata	Cembung
2	RPH 2.1	Bulat	Putih kusam	Tidak rata	Cembung
3	RPH 2.3	Bulat	Putih kusam	Rata	Cembung
4	RPH 2.4	Bulat	Putih kusam	Rata	Cembung
5	RPH 2.5	Bulat	Putih kusam	Rata	Cembung
6	RPH 1.2	Bulat	Pink keoranyean	Rata	Rata
7	RPH 1.3	Bulat kecil	Putih susu	Rata	Cembung
8	RPH 2.2	Bulat	Putih susu	Rata	Rata
9	RPH 2.6	Bulat	Orange kemerahan	Rata	Rata
10	RPH 2.7	Bulat	Putih	Rata	-
11	RPH 2.8	Bulat	Putih	Tidak rata	-
12	RPH 2.9	Bulat	Putih	Rata	Rata

Dari ciri-ciri karakter makroskopis tersebut, hanya lima isolat yang diambil untuk dilakukan pengujian aktivitas proteolitik. Hal ini disebabkan tujuh isolat yang lain diduga kelompok yeast, sementara penelitian ini difokuskan untuk

mencari bakteri-bakteri yang berpotensi dalam menghasilkan enzim protease. Setelah dipilih lima isolat bakteri, selanjutnya dilakukan pengamatan karakter mikroskopis yaitu dengan pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel. Karakter mikroskopis dari kelima isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan diperjelas pada Gambar 4.1.

Tabel 4.2 Karakter mikroskopis lima isolat bakteri proteolitik dari limbah rumah pemotongan hewan Pacar Keling Surabaya

No	Kode Isolat	Bentuk	Gram
1	RPH 1.1	Kokus	Negatif
2	RPH 2.1	Kokus	Negatif
3	RPH 2.3	Basil berantai	Positif
4	RPH 2.4	Kokus	Positif
5	RPH 2.5	Kokus	Negatif



Gambar 4.1 Karakter mikroskopis lima isolat bakteri proteolitik hasil isolasi dari limbah rumah pemotongan hewan Pacar Keling Surabaya dengan menggunakan pewarnaan Gram pada perbesaran 1000x (Keterangan gambar : A. Isolat RPH 1.1; B. Isolat RPH 2.1; C. Isolat RPH 2.3; D. Isolat RPH 2.4; E. Isolat RPH 2.5)

4.2 Uji Karakteristik Isolat Bakteri Penghasil Protease

4.2.1 Uji kualitatif aktivitas proteolitik isolat bakteri penghasil protease

Media yang digunakan untuk uji secara kualitatif pada penelitian ini adalah susu skim yang disuspensikan dalam medium. Isolat bakteri dari agar

miring diambil satu *loopfull* dan ditotolkan pada media susu skim agar *plate*. Setelah inokulasi dan inkubasi kultur *plate* agar, bakteri mensekresikan protease. Hal ini diperlihatkan dengan adanya daerah bening di sekeliling pertumbuhan bakteri.

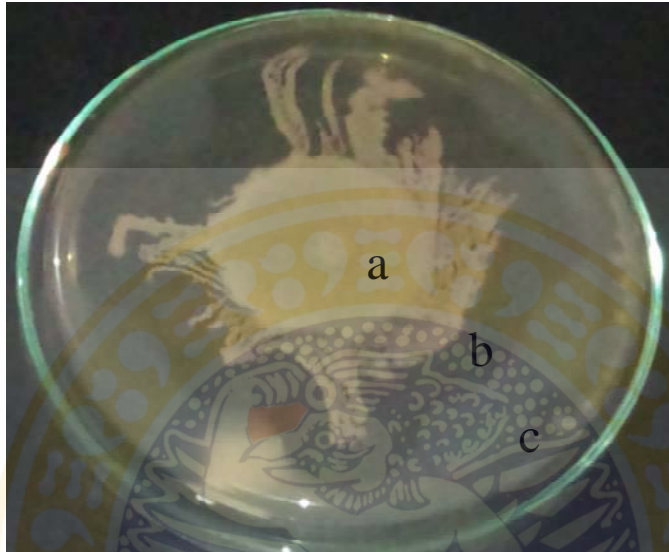
Susu skim mengandung kasein yang berfungsi sebagai substrat enzim. Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsium kalseinat (Pakpahan, 2009). Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease. Protease mengkatalisis degradasi kasein yaitu dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air ke dalam molekul. Reaksi tersebut melepaskan asam amino.

Dari lima isolat yang diuji secara kualitatif, didapatkan bahwa semua isolat menunjukkan adanya aktivitas proteolitik. Aktivitas proteolitik suatu bakteri dapat ditunjukkan dari indeks hidrolisis, dimana dapat dihitung dengan cara membandingkan diameter lingkaran jernih dengan diameter koloni. Dari pengujian tersebut, dipilih satu isolat bakteri yang menunjukkan indeks hidrolisis tertinggi. Hasil uji indeks hidrolisis terhadap lima isolat uji dapat dilihat pada Tabel 4.3 serta hasil indeks hidrolisis terbesar dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Tabel 4.3 Hasil uji indeks hidrolisis pada lima isolat bakteri.

Kode Isolat	Indeks Hidrolisis
RPH 1.1	0,23 ± 0,025
RPH 2.1	0,98 ± 0,025
RPH 2.3	1,77 ± 0,025

RPH 2.4	$1,14 \pm 0,025$
RPH 2.5	$1,55 \pm 0,025$



Gambar 4.2 Zona jernih sebagai indikator adanya aktivitas hidrolisis dari isolat terpilih RPH 2.3 (Keterangan gambar : a. Koloni bakteri, b. zona hidrolisis, c. media skim milk agar)

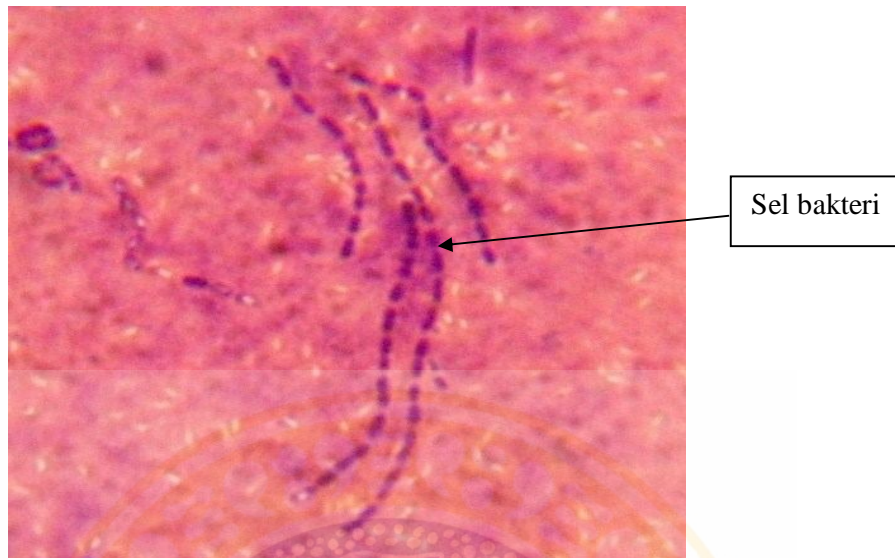
Zona jernih yang terbentuk ini dikarenakan bakteri mensekresikan enzim protease yang digunakan untuk menghidrolisis kasein menjadi asam amino. Menurut Lehninger (2005), aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH, konsentrasi substrat dan enzim, suhu dan adanya aktivator atau inhibitor.

Adanya perbedaan diameter zona jernih ini disebabkan perbedaan kemampuan tiap mikroba dalam memproduksi enzim protease, sehingga aktivitas yang dihasilkan juga berbeda. Untuk itu, kandungan protease dalam bakteri tersebut perlu ditentukan secara kuantitatif (Susanti, 2003).

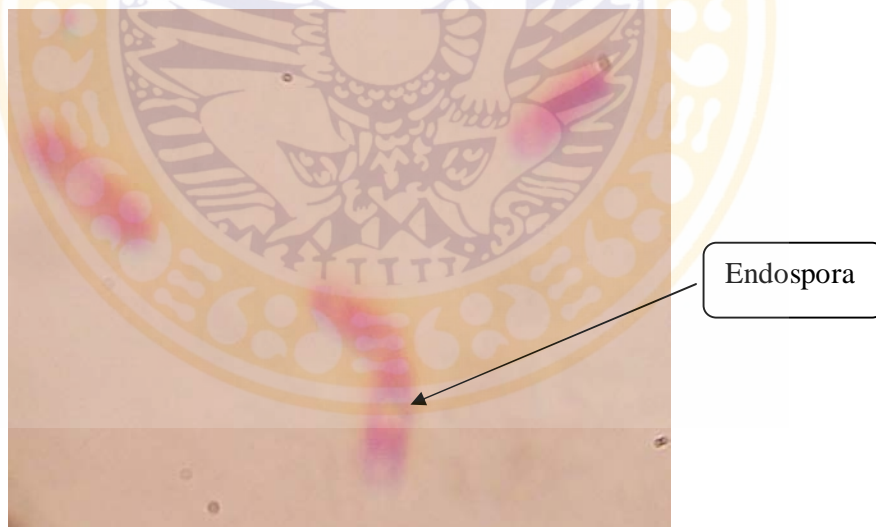
Untuk memperoleh hasil kandungan protease bakteri secara kuantitatif, dilakukan produksi enzim protease terlebih dahulu dan diiringi dengan pembuatan kurva pertumbuhan bakteri terpilih.

4.2.2 Uji karakteristik mikroskopis dan fisiologis isolat bakteri penghasil protease

Dari data di atas, isolat bakteri terpilih yang memiliki indeks hidrolisis terbesar adalah isolat berkode RPH 2.3 yaitu sebesar 1,77 mm. Dari hasil pengamatan mikroskopis pewarnaan Gram, beberapa hasil uji fisiologis menggunakan kit Microbact 12A dan 12B, pewarnaan endospora, dan uji amilase, dengan menggunakan perhitungan persentase indeks kesamaan menggunakan koefisien sebanding (Barrow, *et al.*,1993) menunjukkan bahwa isolat RPH 2.3 memiliki persentase indeks kesamaan sebesar 71% terhadap genus *Bacillus* gram positif, berbentuk basil berantai, membentuk endospora, dan bersifat katalase positif. Hasil pewarnaan gram dan pewarnaan endospora isolat RPH 2.3 dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan 4.4, serta hasil uji fisiologis menggunakan kit Microbact 12A dan 12B dapat dilihat pada lampiran.



Gambar 4.3 Hasil pewarnaan gram isolat RPH 2.3 dan diamati dengan perbesaran 1000x



Gambar 4.4 Hasil pewarnaan endospora isolat RPH 2.3 dan diamati dengan perbesaran 1000x

4.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri dan Produksi Enzim Protease dari Bakteri Terpilih

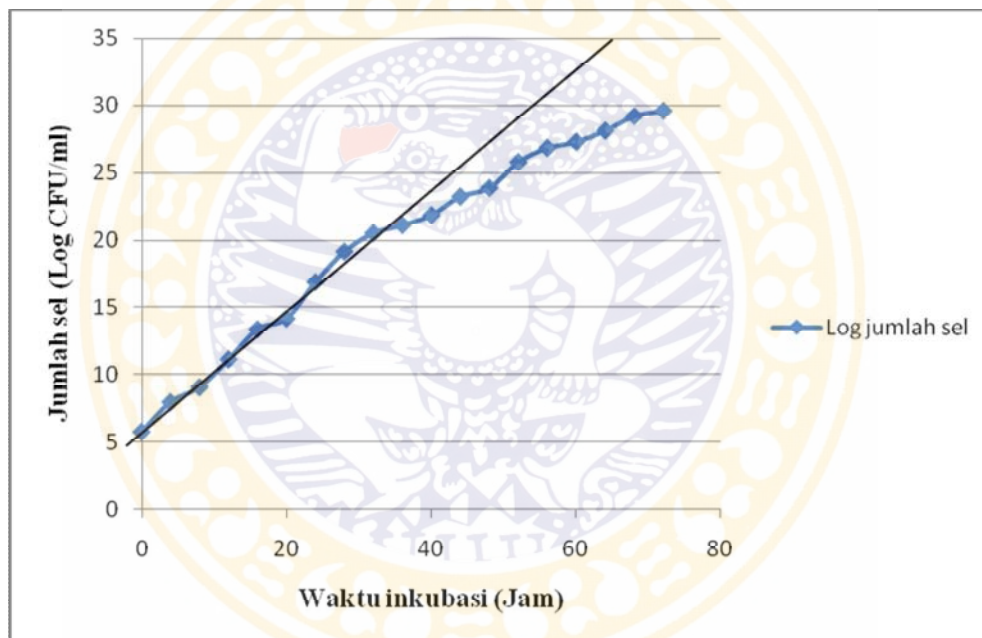
Istilah pertumbuhan yang umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain, yang biasanya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen sel (pertambahan total sel) dan bukan perubahan individu organisme. Bakteri memiliki ciri khas bereproduksi yaitu dengan pembelahan biner melintang, di mana satu sel bakteri membelah diri, dan menghasilkan dua sel. Selang waktu yang dibutuhkan bagi sel untuk membelah diri atau untuk populasi menjadi dua kali lipat dikenal sebagai waktu generasi. Tidak semua spesies bakteri mempunyai waktu generasi yang sama. Waktu generasi untuk suatu spesies bakteri tertentu juga tidak sama pada segala kondisi. Waktu generasi sangat bergantung pada kecukupan nutrisi di dalam medium, serta pada kesesuaian kondisi fisik (Pelczar dan Chan, 2005).

Pada penelitian ini, pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dan pengukuran produksi enzim dari bakteri terpilih dilakukan menurut metode Enggel *et al.* (2004), pada selang waktu inkubasi 4 jam sekali selama 3 hari. Kekeruhan medium pada selang waktu tertentu mengindikasikan bahwa bakteri memperbanyak sel dalam medium. Kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh, berkembang, memperbanyak diri dan mensekresikan enzim ke medium kultur (Susanti, 2003).

Starter berupa kultur bakteri dalam media *Nutrien Broth* dengan *Optical Density* 0,5 pada panjang gelombang 660 nm, sebanyak 1% kultur bakteri dimasukkan ke dalam medium produksi protease. Kemudian dilakukan

penghitungan jumlah sel untuk pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dengan metode *Total Plate Count* selama inkubasi 3 hari, dan diiringi dengan produksi enzim protease.

Hasil perhitungan dengan cara hitungan cawan yang menggunakan *Total Plate Count* (TPC) diperoleh grafik yang menghubungkan antara waktu inkubasi dan jumlah sel yang dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Kurva pertumbuhan *Bacillus sp.* RPH 2.3 yang ditumbuhkan pada media *skim milk* selama 72 jam

Dari data di atas jika dihubungkan garis lurus pada waktu inkubasi 4 jam hingga 32 jam bakteri mengalami fase log. Fase log yaitu fase dimana setelah mikroba menyesuaikan diri dengan lingkungan, maka sel mikroba membelah dengan cepat. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya, seperti pH, kandungan nutrisi, suhu dan kelembaban

udara. Pada fase ini sel membutuhkan energi lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya, selain itu sel paling sensitif terhadap keadaan lingkungan.

Pada waktu inkubasi setelah 32 jam, bakteri mengalami fase eksponensial diperlambat. Pada fase ini pertumbuhan bakteri diperlambat, karena beberapa sebab, diantaranya berkurangnya nutrisi di dalam medium, dan adanya zat hasil metabolisme yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sel konstan, tetapi jumlah populasi masih naik. Hal ini karena jumlah sel yang tumbuh lebih banyak daripada jumlah sel yang mati.

Pada waktu inkubasi setelah 68 jam, bakteri mengalami fase stasioner. Pada fase ini jumlah populasi sel relatif tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Pada fase stasioner ini sel kehabisan nutrisi untuk tumbuh dan membelah sehingga jumlah pertumbuhan sel cenderung mendatar atau terjadi akumulasi produk toksik akibat metabolisme sehingga mengganggu pembelahan sel.

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba adalah tersedianya nutrisi, air, suhu, pH, oksigen, potensial oksidasi reduksi, adanya zat-zat penghambat, dan adanya jasad renik lain. Mikroba membutuhkan nutrisi untuk kehidupan dan pertumbuhannya sebagai sumber karbon, sumber nitrogen, sumber energi dan faktor pertumbuhan lain seperti vitamin dan mineral. Nutrien tersebut dibutuhkan untuk membentuk energi dan menyusun komponen-komponen sel (Waluyo, 2004).

Nutrien yang dibutuhkan bakteri pada penelitian ini tersedia dari media pertumbuhannya, yaitu susu skim yang di kombinasi dengan media *Bushnell*

Hass. Susu merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrien. Komposisi susu yaitu air, lemak, protein, laktosa, mineral, vitamin dan enzim. Sedangkan susu skim merupakan susu dengan kadar lemak yang rendah. Jadi susu skim masih memiliki semua bahan yang dibutuhkan mikroba untuk kehidupan dan pertumbuhannya.

Setelah membuat kurva pertumbuhan bakteri, dilanjutkan dengan pengujian aktivitas proteolitik secara kuantitatif. Hal ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas proteolitik berdasarkan jumlah asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein.

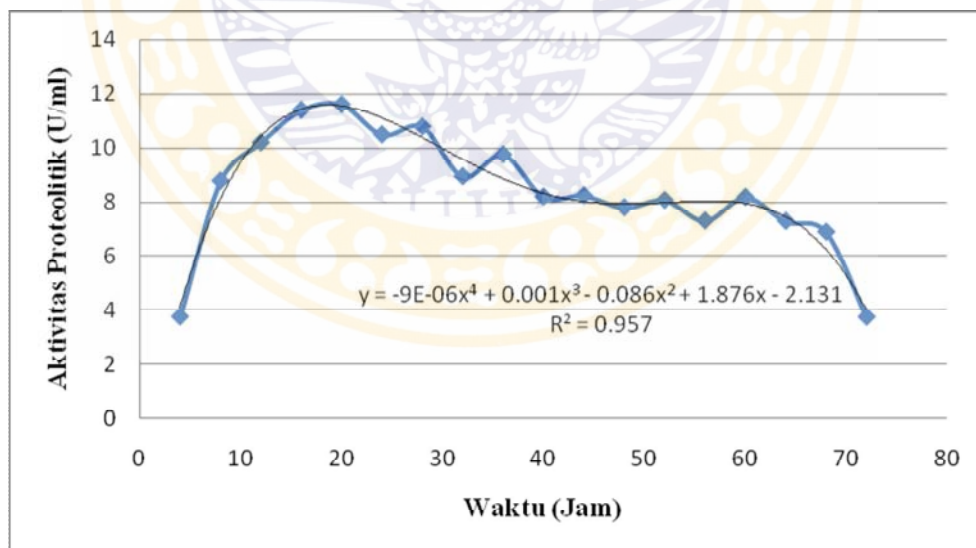
4.4 Uji kuantitatif aktivitas proteolitik dari isolat bakteri terpilih

Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida, dan protein menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti, 2002). Proses pemecahan ikatan peptida menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana oleh enzim protease disebut aktivitas proteolitik.

Aktivitas proteolitik ditentukan dengan metode Enggel, (2004). Pada metode ini kasein digunakan sebagai substrat. Enzim protease yang disekresi oleh sel bakteri akan menghidrolisis kasein untuk menghasilkan asam amino. Besarnya aktivitas proteolitik ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein, dan dilakukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 660 nm.

Pada tahap pengukuran aktivitas proteolitik tersebut juga digunakan asam trikloroasetat (TCA) yang berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik. Selain itu juga digunakan natrium karbonat (Na_2CO_3) yang dapat mengikat air di dalam larutan. Sebagai reagen pewarna digunakan *Folin Ciocalteu* yang akan bereaksi dengan protein dan memberikan warna biru gelap. Intensitas warna yang terbentuk tergantung pada jumlah asam amino aromatik yang ada di dalam larutan tersebut.

Satu unit aktivitas proteolitik dinyatakan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1 μg tirosin setiap ml setiap menit dalam kondisi pengukuran. Hasil pengujian aktivitas proteolitik dari isolat bakteri yang terpilih dengan waktu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Uji aktivitas proteolitik *Bacillus* sp. RPH 2.3 yang ditumbuhkan pada media *skim milk* selama 72 jam (Keterangan gambar : —◆— Aktivitas proteolitik (U/ml) — poly.(Aktivitas proteolitik (U/ml)))

Dari hasil pengujian aktivitas proteolitik menunjukkan *Bacillus sp.* RPH 2.3 aktif menghasilkan protease selama pertumbuhannya. Pada grafik dapat dilihat *Bacillus sp.* RPH 2.3 memiliki aktivitas proteolitik secara kuantitatif yang tertinggi sebesar 11,60 U/ml dengan waktu inkubasi 20 jam pada suhu 37°C dan pada pH 6,5.

Pada pH 6,5 ini merupakan pH optimum, karena pada kondisi pH ini enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya. Tetapi, pada waktu inkubasi setelah 20 jam dengan pH 7, aktivitas proteolitik semakin menurun. Hal ini disebabkan, pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Menurut Poedjiadi (1994), dapat diketahui bahwa enzim merupakan molekul protein yang kestabilannya dapat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan, dimana pada kondisi keasaman yang ekstrim molekul-molekul protein enzim akan rusak.

Pada penelitian Akhdiya (2003), menggunakan bakteri pembanding yaitu *Bacillus firmus* NRRL B-1107 yang diperoleh dari Northern Utilization Research and Development Division of the US Departement of Agriculture, Peoria, Illinois. Bakteri tersebut memiliki aktivitas protease sebesar 11,259 U/ml dengan suhu inkubasi 37°C. Jika dibandingkan dengan penelitian yang sudah ada, *Bacillus sp.* RPH 2.3 ini dengan suhu inkubasi 37°C memiliki aktivitas yang lebih besar daripada *Bacillus firmus* NRRL B-1107 yang merupakan bakteri mesofil.

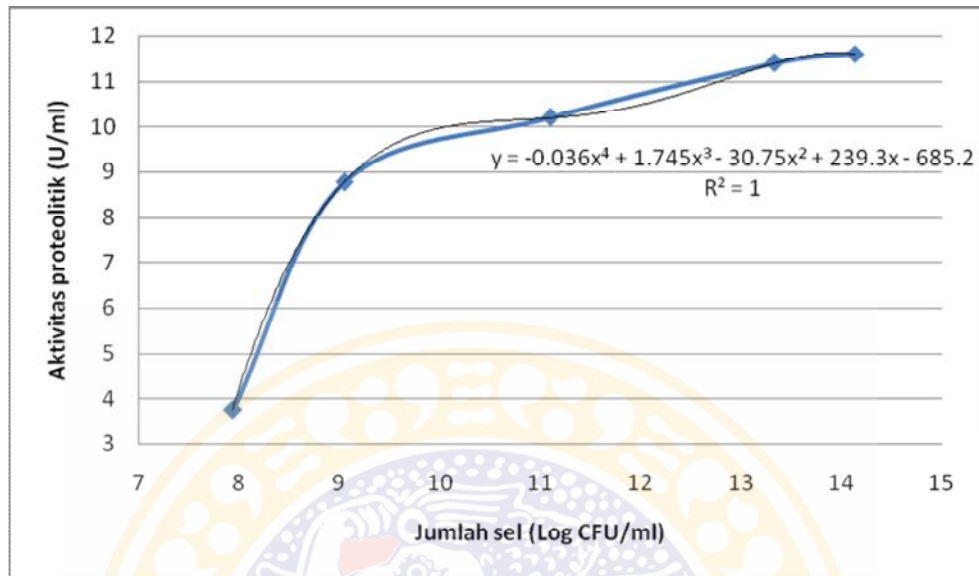
Menurut penelitian Naiola dan Widhyastuti (2002), menyatakan bahwa *Bacillus sp.* yang diisolasi dari makanan fermentasi, tanah dan air sungai memiliki aktivitas protease tertinggi sebesar 1,14 U/ml dengan kondisi pH optimum

berkisar antara 5,0-6,0. Dari penelitian tersebut dapat terlihat kecenderungan media yang sesuai untuk produksi protease adalah media dengan kondisi pH sedikit asam sampai netral.

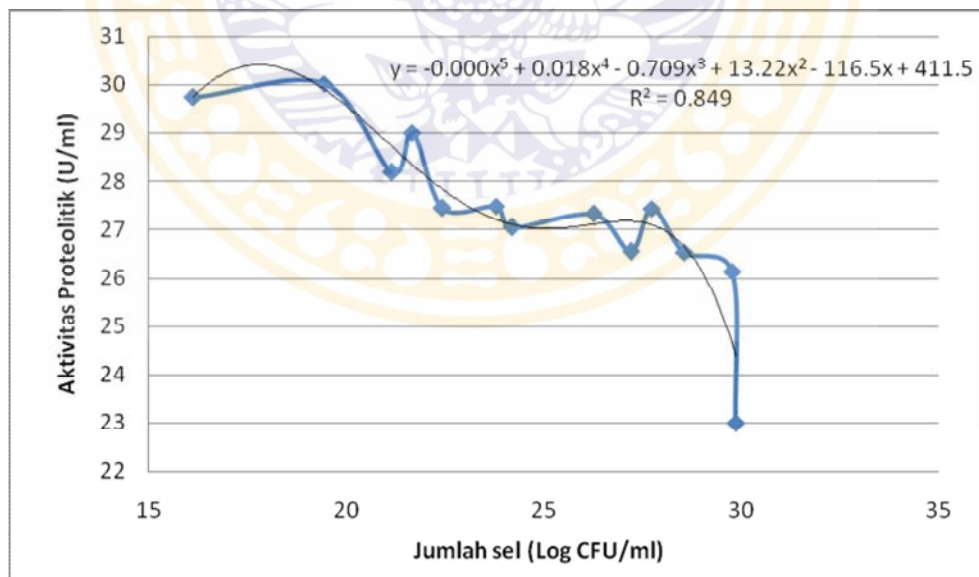
Jika dihubungkan antara kurva pertumbuhan bakteri dengan uji aktivitas proteolitik dapat dilihat bahwa pada fase pertumbuhan cepat bakteri menghasilkan aktivitas proteolitik tinggi yang dicapai pada waktu inkubasi 20 jam. Hal ini disebabkan masih tersedianya nutrisi dalam jumlah besar yang diperlukan sel bakteri untuk melakukan metabolisme sel, sehingga jumlah log sel bakteri juga mengalami peningkatan, yaitu sebesar 14,14 CFU/ml.

Pada waktu inkubasi setelah 20 jam, aktivitas enzim protease yang dihasilkan mengalami penurunan. Jika dihubungkan dengan kurva pertumbuhan bakteri, pada waktu inkubasi setelah 20 jam ini bakteri menuju fase eksponensial diperlambat. Hal ini disebabkan karena beberapa faktor, seperti zat nutrisi di dalam medium sudah mulai berkurang yang mengakibatkan jumlah sel mikroorganisme sedikit, sehingga enzim yang disekresikan juga semakin menurun. Selain itu, adanya hasil metabolisme yang mungkin beracun sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Pada 68 jam bakteri menghasilkan aktivitas enzim yang semakin menurun. Hal ini disebabkan karena pertumbuhan bakteri pada saat tersebut mengalami fase stasioner dimana zat nutrisi di dalam medium sangat sedikit, sehingga aktivitas yang dihasilkan juga semakin menurun. Hubungan antara kurva pertumbuhan bakteri dengan uji aktivitas proteolitik pada waktu inkubasi 4 hingga 20 jam dan 24 hingga 72 jam dapat dilihat pada Gambar 4.7 dan 4.8.



Gambar 4.7. Hubungan antara kurva pertumbuhan dengan uji aktivitas proteolitik *Bacillus sp.* RPH 2.3 pada waktu inkubasi 4 jam hingga 20 jam



Gambar 4.8. Hubungan antara kurva pertumbuhan dengan uji aktivitas proteolitik *Bacillus sp.* RPH 2.3 pada waktu inkubasi 24 jam hingga 72 jam

Dari grafik 4.7 dapat dilihat bahwa aktivitas proteolitik pada waktu inkubasi 4 hingga 20 jam semakin meningkat serta diiringi dengan meningkatnya kurva pertumbuhan bakteri. Telah dijelaskan sebelumnya, pada waktu inkubasi hingga 20 jam bakteri mengalami fase log. Dimana pada fase ini bakteri membutuhkan nutrisi yang banyak untuk pertumbuhan dan pembelahan sel. Pada penelitian ini nutrisi atau substrat yang digunakan adalah kasein, dimana dapat dihubungkan dengan salah satu ciri enzim yaitu kekhususan yang tinggi terhadap substrat. Mekanisme reaksi enzimnya adalah enzim dan substrat akan bergabung menjadi kompleks enzim substrat, yang kemudian terurai menjadi produk. Enzim tersebut tidak dikonsumsi di dalam reaksinya tetapi dilepaskan kembali untuk reaksi selanjutnya. Proses ini diulang-ulang sampai semua molekul substansi yang tersedia habis terpakai.

Banyak bakteri dapat menghancurkan protein di luar tubuhnya dan menggunakan produk-produk hasil proses tersebut sebagai sumber tenaga karbon dan nitrogen. Karena molekul protein terlalu besar untuk dapat melewati membran, bakteri mensekresikan protease yang menghidrolisis protein tersebut menjadi peptide-peptide. Bakteri menghasilkan peptidase yang menguraikan peptide menjadi asam-asam amino yang diperlukan untuk metabolisme (Pelczar dan Chan, 2005).

Sedangkan pada grafik 4.8 dapat dilihat bahwa pada waktu inkubasi setelah 20 jam aktivitas proteolitik cenderung menurun tetapi kurva pertumbuhan bakteri masih meningkat. Hal ini dikarenakan adanya pengendalian aktivitas enzim yang diatur oleh ligan (molekul yang dapat terikat oleh enzim) yang tidak

turut berperan dalam proses katalitik itu sendiri. Pengendalian aktivitas enzim yang dimaksud adalah hambatan arus-balik (*feedback inhibition*). Pada hambatan arus-balik, ligan pengaturnya adalah produk akhir suatu lintasan metabolik yang dapat menghentikan sintesisnya sendiri dengan cara menghambat aktivitas enzim. Produk akhir dari reaksi enzim disini adalah asam amino, dimana asam amino akan menghambat aktivitas protease jika asam amino yang dihasilkan menumpuk. Sehingga mengakibatkan aktivitas enzim protease yang dihasilkan menurun (Pelczar dan Chan, 2005).

Penurunan aktivitas proteolitik ini juga dapat terjadi karena berkurangnya jumlah substrat yang akan menghambat pembentukan kompleks enzim substrat dan perubahan struktur enzim yang akan menyebabkan penurunan laju katalitik. Akibat perubahan struktur enzim, sisi aktif enzim mengalami perubahan bentuk sehingga tidak dapat digunakan secara baik dalam mengikat substrat (Pakpahan, 2009).

4.5 Menentukan Titik Maksimum Grafik Uji Aktivitas proteolitik

Dari grafik uji aktivitas enzim protease, didapatkan fungsi $y = -0,025x^2 + 1,060x + 0,826$ dan $R^2 = 0,920$. Dari fungsi tersebut, didapatkan titik maksimum dengan $x = 21,2$ dan $y = 12,062$. Dari hasil yang diperoleh, dapat dijelaskan bahwa titik maksimum dari grafik tersebut ada diantara 20 jam dan 24 jam. Pada titik maksimum tersebut, merupakan fase log pertumbuhan dengan aktivitas enzim yang tinggi. Hasil perhitungan dengan menggunakan program Mathematica 5 dapat dilihat pada lampiran 12.