

## Lampiran 1. Ringkasan Penelitian

### SKRINING DAN UJI AKTIVITAS ENZIM PROTEASE BAKTERI DARI LIMBAH RUMAH PEMOTONGAN HEWAN

Yunita Silvia Putri, Fatimah S.Si., M.Kes dan Dr. Sri Sumarsih M.Si.  
Prodi S-1 Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi,  
Universitas Airlangga, Surabaya

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan melakukan skrining dan uji aktivitas enzim protease bakteri hasil isolasi dari limbah rumah pemotongan hewan (RPH). Pengujian secara kualitatif terhadap bakteri penghasil enzim protease dilakukan dengan menggunakan media susu skim agar. Bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik ditandai dengan adanya zona bening disekitar pertumbuhan bakteri. Dari hasil skrining diperoleh 5 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik, yaitu RPH 1.1 dengan hasil indeks proteolitik sebesar 0,23; RPH 2.1 sebesar 0,98; RPH 2.3 sebesar 1,77; RPH 2.4 sebesar 1,14; RPH 2.5 sebesar 1,55. Dari kelima isolat, dipilih 1 isolat dengan indeks proteolitik terbesar yaitu isolat RPH 2.3 untuk diuji aktivitas enzimnya. Enzim protease dari isolat RPH 2.3 diproduksi dalam media yang mengandung susu skim 2% yang dilarutkan dalam media cair Bussnell Hass. Pengukuran aktivitas enzim protease isolat RPH 2.3 dilakukan menurut metode Enggel *et al.*, yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 660 nm. Pengukuran uji aktivitas enzim protease ditentukan terhadap substrat dengan menggunakan kasein yang dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7,0 pada suhu 37°C. Aktivitas protease isolat RPH 2.3 sebesar 11,60 U/ml dengan waktu inkubasi optimal 20 jam pada suhu 37°C dan pH 6,5.

**Kata kunci:** Bakteri proteolitik, aktivitas enzim protease, rumah pemotongan hewan

#### ABSTRACT

The aim of this study was to explore protease producing bacteria from waste of slaughterhouse. Qualitative test to the bacteria that produce protease enzyme was conducted by using skim milk agar medium. Bacteria that have proteolytic activity were characterized by presence of clear zone around of the growing bacteria. The result of screening, were 5 isolates bacteria had proteolytic activity. They were RPH 1.1 with index of proteolytic 0,23; RPH 2.1 with index of 0,98; RPH 2.3 with index of 1,77; RPH 2.4 with index of 1,14; RPH 2.5 with index of 1,55. From the five were isolated bacteria above, one of them with the highest index (RPH 2.3) was selected to be tested in enzyme activity. Protease enzyme from RPH 2.3 was produced in medium that contain soluble skim milk 2% in Bussnell Hass liquid medium. The protease enzyme activity of RPH 2.3 was measured by Enggel *et al.* method, using UV-vis spectrophotometer at 660 nm. Measurement of protease enzyme test was determined against substrate by using soluble casein in phosphate buffer pH 7,0 and a temperature of 37°C.

Protease activity from bacteria RPH 2.3 was 11,60 U/ml with optimum incubation on 20 hours at 37°C, pH 6,5 condition.

**Keywords:** proteolytic bacteria, protease enzyme activity, slaughterhouses

### **Pendahuluan**

Dalam beberapa tahun terakhir ini, industri enzim telah berkembang pesat dan berperan penting dalam dunia industri. Kesadaran masyarakat akan kondisi lingkungan menjadikan enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan proses kimiawi dalam bidang industri (Falch, 1991). Hal ini disebabkan, sifat enzim sebagai biokatalisator yang efisien, selektif, ekonomis, tidak beracun dan mengkatalisis reaksi tanpa produk samping, serta ramah lingkungan (Manitto, 1992). Kemajuan dalam teknologi fermentasi, rekayasa genetika dan teknologi aplikasi enzim menyebabkan penggunaan enzim dalam industri semakin luas.

Salah satu jenis enzim yang aplikasinya sangat luas adalah enzim protease karena memiliki nilai ekonomi yang tinggi dalam bidang industri, antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, dan pada proses pengolahan limbah industri (Nascimento dan Martin, 2006).

Di Indonesia kebutuhan akan enzim protease semakin meningkat, namun kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut adalah dengan mengupayakan untuk memproduksi enzim protease dengan mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya hayati yang dimiliki oleh Indonesia (Suhartono, 2000).

Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan maupun mikroorganisme. Enzim yang berasal dari tanaman maupun hewan memiliki kelemahan apabila digunakan atau diproduksi, hal tersebut dikarenakan jaringan pada tanaman mengandung bahan yang berbahaya, seperti senyawa fenolik, faktor fisiologi pada organisme yang membutuhkan waktu sangat lama dan adanya inhibitor enzim. Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya diproduksi dari mikroorganisme. Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim protease mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah (Thomas, 1989).

Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, eksplorasi mikroorganisme yang berpotensi sebagai penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia. Keragaman hayati Indonesia yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim protease (Akhdiya, 2003). Isolasi mikroba penghasil protease basa telah dilaporkan dari berbagai sumber, antara lain tanah yang dicirikan oleh pH yang tinggi dan atau adanya kontaminasi deterjen, pabrik pengolahan susu, dan rumah pemotongan hewan (Adinarayana *et al.*, 2003).

Rumah pemotongan hewan (RPH) merupakan salah satu industri penghasil limbah organik. RPH ini hampir dijumpai di setiap kota di Indonesia, baik kota besar maupun kota kecil, dan pada umumnya belum mempunyai alat pengolahan limbah. Limbah cair Rumah Pemotongan Hewan (RPH) mengandung bahan

organik dengan konsentrasi tinggi, padatan tersuspensi, serta bahan koloid seperti lemak, protein, dan selulosa. Limbah RPH yang berupa feces, urine, isi rumen atau isi lambung, darah, daging atau lemak, dan air cucuannya, dapat bertindak sebagai media pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba yang mampu mengurai bahan organik seperti protein dan lemak, sehingga limbah tersebut mudah mengalami pembusukan (Roihatin, 2006).

Dari latar belakang permasalahan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat bakteri penghasil enzim protease dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH), mengetahui genus dari bakteri yang menunjukkan Indeks Proteolitik tertinggi dan mendapatkan nilai aktivitas proteolitik dari genus bakteri yang terpilih.

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat bakteri lokal yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease, dan memberikan informasi ilmiah tentang bakteri yang berpotensi menghasilkan protease untuk diaplikasikan secara luas khususnya dalam dunia industri.

## **Metode Penelitian**

### **a. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi dan Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Desember 2010 sampai dengan Juli 2011.

### **b. Bahan penelitian**

Pada penelitian uji aktivitas enzim protease ini menggunakan media susu skim. Media skim milk agar dengan campuran media cair Bussnell Hass (BH) merupakan media selektif yang digunakan sebagai media uji kualitatif dengan komposisi sebagai berikut: skim milk 2%; 0,1 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 gram  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 gram  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,02 gram  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 gram  $\text{FeCl}_3$ ; 0,002 gram  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; dan agar powder 1,5 gram; media skim milk dengan campuran media cair Bussnell Hass tanpa penambahan agar merupakan media starter dan media produksi yang digunakan sebagai media uji kuantitatif; 2% kasein dalam larutan buffer fosfat pH 7 sebagai substrat; 0,4 M asam trikloroasetat (TCA) yang digunakan untuk menghentikan reaksi (menginaktifkan enzim); 0,5 M natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) untuk mengikat air yang masih tersisa dan reagen *Folin Ciocalteau* untuk memberi warna pada larutan.

### **c. Prosedur penelitian**

#### **1. Uji karakteristik bakteri secara makroskopis**

Pengambilan sampel dilakukan di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) pacar keling, Surabaya. Pengambilan sampel limbah cair dilakukan pada 2 tempat yang berbeda, yaitu pada bak pencucian hewan yang telah disembelih dan pada tempat pencucian ayam yang telah dipotong. Sampel tersebut dimasukkan dalam botol sampel yang berukuran 600 ml sebanyak 420 ml atau  $\frac{3}{4}$  bagian dari botol

sampel tersebut, dan segera dibawa ke laboratorium untuk segera dianalisis. Bakteri hasil isolasi dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) dilakukan uji karakteristik secara makroskopis pada media *Nutrient Agar (NA) plate*. Uji karakteristik secara makroskopis dapat diketahui dari warna, bentuk, tepi dan elevasi dari koloni.

## 2. Uji kualitatif isolat bakteri

Uji kemampuan bakteri terhadap aktivitas proteolitik secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan satu *loopfull* isolat bakteri pada permukaan media selektif, setelah ditumbuhkan pada media selektif lalu diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 sampai 48 jam, aktivitas mikroba dalam mendegradasi protein ditunjukkan dengan adanya zona *halo* (lingkaran jernih) di sekitar koloni. Isolat dengan nilai indeks proteolitik tertinggi dilanjutkan dengan uji aktivitas enzim protease.

## 3. Produksi enzim dari bakteri terpilih

Untuk produksi enzim dari bakteri terpilih digunakan starter. Starter tersebut berasal dari bakteri yang diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Broth (NB)* dan diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah 24 jam starter tersebut diukur nilai *Optical density (OD)* dengan alat spektrofotometer pada  $\lambda = 660 \text{ nm}$ , sampai didapatkan *Optical density (OD)* sebesar 0,5. Sebanyak 1% starter diinokulasikan ke dalam 20 ml media produksi (media susu skim dan media Bussnell Hass). Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 3 hari, dan dilakukan pengambilan sampel kultur setiap 4 jam sekali. Pada setiap pengambilan kultur setelah 4 jam sekali, kultur tersebut disentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 15 menit yang digunakan untuk memisahkan filtrat atau supernatan dari biomassa sel. Supernatan yang diperoleh diukur aktivitas proteolitiknya.

## 4. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri

Kurva pertumbuhan mikroba di buat bersamaan dengan proses produksi. Sebanyak 4 ml suspensi sel dari starter diukur nilai *Optical density (OD)* dengan alat spektrofotometer pada  $\lambda = 660 \text{ nm}$ , sampai didapatkan *Optical density (OD)* sebesar 0,5. 0,2 ml starter diinokulasikan ke dalam 19,8 ml media produksi yaitu media susu skim yang ditambahkan dengan media cair Bussnell Hass. Kultur diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu kamar selama 3 hari, dan dilakukan pengambilan sampel kultur setiap 4 jam sekali. Dari kultur diambil 1 ml dan dilakukan pengenceran. Kemudian penghitungan jumlah selnya dilakukan dengan metode *Total Plate Count (TPC)*. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan mikroba antara hasil penghitungan TPC dengan *Optical density (OD)*.

## 5. Pengukuran aktivitas proteolitik

Pengukuran aktivitas proteolitik dilakukan menurut metode yang dilakukan Enggel *et al.* (2004). Sebanyak 0,25 ml larutan enzim ditambahkan dengan 0,25 ml larutan buffer fosfat pH 7 dan dipreinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah dipreinkubasi ditambahkan 0,25 ml substrat (2% kasein dalam buffer fosfat pH 7), campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 ml 0,4 M asam trikloroasetat (TCA), yang selanjutnya disentrifugasi untuk diambil supernatannya. Sebanyak 0,2 ml supernatan ditambahkan dengan 1 ml 0,5 M Natrium karbonat, dipreinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan dengan 0,2 ml reagen *Folin Ciocalteau* dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Melakukan pembacaan *Optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Untuk setiap kali pengujian, hasil sampel dikurangi dengan blanko. Setelah terpilih isolat bakteri yang memiliki nilai aktivitas tertinggi, maka dilakukan tahap identifikasi bakteri.

## 6. Tahap identifikasi bakteri

Tahap identifikasi bakteri menggunakan 2 uji, yaitu uji pewarnaan Gram dan uji pewarnaan endospora. **Uji morfologi pewarnaan Gram.** Isolat bakteri dengan indeks proteolitik tertinggi dikarakterisasi lanjut secara mikroskopis dengan cara pewarnaan Gram. Untuk memulai pengujian dengan cara pewarnaan Gram dilakukan pembuatan apusan pada kaca obyek dengan fiksasi panas. Apusan tersebut ditetesi atau direndam dengan kristal violet selama 1 menit, setelah 1 menit dicuci dengan air mengalir. Setelah itu merendam apusan tersebut dengan lugol selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian ditetesi dengan alkohol 95% selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir seperti cara sebelumnya. Untuk reagen terakhir yaitu direndam dengan safranin selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas penyerap. Selanjutnya mengamati hasil pewarnaan di atas mikroskop dengan perbesaran 1000x.

**Uji pewarnaan endospora.** Uji pewarnaan endospora ini menggunakan metode Schaeffer-Fulton, yang menggunakan 2 pewarna, yaitu malachite green dan safranin. Sebelum memulai pengujian, isolat bakteri diinkubasi selama 24 hingga 48 jam. Setelah inkubasi 24 jam, dibuat apusan pada kaca obyek dengan fiksasi panas. Apusan tersebut ditetesi atau direndam dengan malachite green dan diuapkan di atas gelas *Beaker* berisi air yang dipanaskan selama 5 menit. Setelah 5 menit, apusan didinginkan dan dibilas dengan air selama 30 detik. Setelah 30 detik, ditetesi dengan safranin dan direndam selama 20 detik. Kemudian dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa safranin. Apusan yang telah dibilas lalu dikeringkan dengan kertas penyerap. Selanjutnya diamati hasil pewarnaan dengan mikroskop pada perbesaran 1000x.

## 7. Penentuan titik maksimum grafik uji aktivitas proteolitik

Setelah didapatkan hasil uji aktivitas enzim protease, ditentukan regresi dan fungsi  $y$  dari grafik tersebut. Dari regresi dan fungsi  $y$  yang didapat,

ditentukan titik maksimum dari grafik tersebut dengan menggunakan program Mathematica 5.

## Hasil dan Pembahasan

### 1. Isolasi dan Karakterisasi Isolat Bakteri Penghasil Enzim Protease

Hasil isolasi dan karakterisasi isolat bakteri dari limbah rumah pemotongan hewan didapatkan 12 isolat mikroba (5 bakteri, 7 yeast) dengan karakteristik koloni yang berbeda (Tabel 1). Karakter makroskopis dapat diketahui dari bentuk koloni, warna koloni, tepi dan elevasi dari koloni.

Tabel 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, hanya 5 isolat yang diambil untuk dilakukan pengujian aktivitas proteolitik. Hal ini disebabkan 7 isolat yang lain diduga kelompok yeast, sementara penelitian ini difokuskan untuk mencari bakteri-bakteri yang berpotensi dalam menghasilkan enzim protease. Setelah dipilih 5 isolat bakteri, selanjutnya dilakukan pengamatan karakter mikroskopis yaitu dengan pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel (Tabel 2).

Tabel 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

## 2. Uji karakteristik isolat bakteri penghasil protease

Hasil uji karakteristik isolat bakteri penghasil protease menggunakan 2 pengujian, yaitu uji kualitatif isolat bakteri dan uji mikroskopis serta fisiologis isolat bakteri penghasil protease. Untuk hasil uji kualitatif isolat bakteri penghasil protease dapat ditunjukkan dari indeks hidrolisis, yang dapat diperlihatkan dengan adanya daerah bening di sekeliling pertumbuhan bakteri. Dari kelima isolat bakteri menunjukkan bahwa semua isolat tersebut memiliki aktivitas proteolitik (Tabel 3).

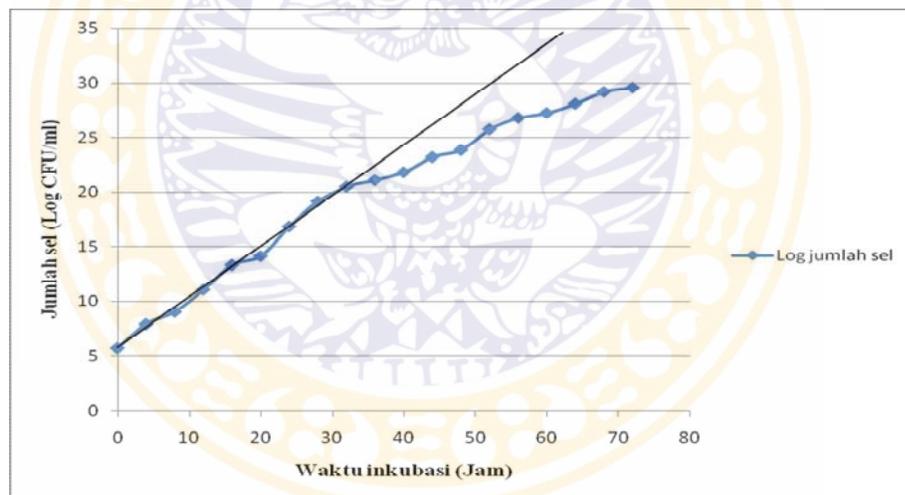
Tabel 3. Hasil uji indeks hidrolisis pada lima isolat

Kode Isolat	Indeks Hidrolisis
RPH 1.1	0,23 ± 0,025
RPH 2.1	0,98 ± 0,025
<b>RPH 2.3</b>	<b>1,77 ± 0,025</b>
RPH 2.4	1,14 ± 0,025
RPH 2.5	1,55 ± 0,025

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.

### 3. Kurva pertumbuhan bakteri dan produksi enzim protease dari bakteri terpilih

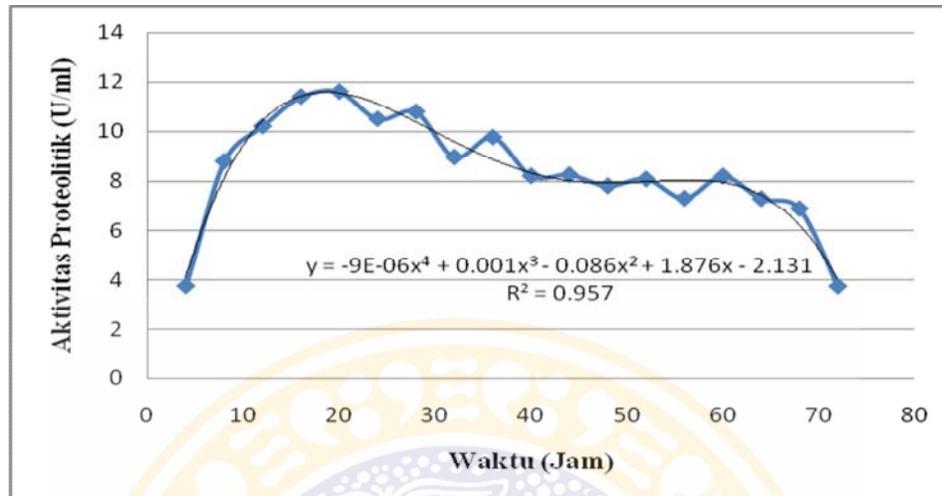
Hasil kurva pertumbuhan bakteri dan produksi enzim protease dari bakteri terpilih menunjukkan pada waktu inkubasi 4 jam hingga 32 jam bakteri mengalami fase log yang ditunjukkan oleh pertumbuhan sel yang cepat karena masih tersedianya nutrisi yang banyak. Pada waktu inkubasi setelah 32 jam, bakteri mengalami fase eksponensial diperlambat karena pada fase ini nutrisi yang tersedia sudah mulai berkurang dan sel masih terus membelah. Sedangkan pada waktu inkubasi setelah 68 jam, bakteri mengalami fase stasioner dimana pada fase ini sel kehabisan nutrisi untuk tumbuh dan membelah sehingga pertumbuhan sel cenderung mendatar (Gambar 1). 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).



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Bacillus sp.* RPH 2.3 yang ditumbuhkan pada media *skim milk* selama 72 jam

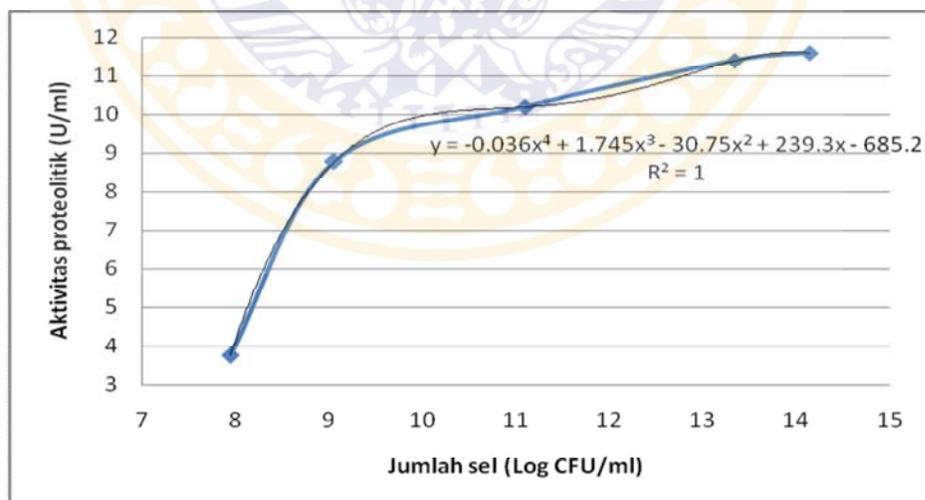
### 4. Uji kuantitatif aktivitas proteolitik dari isolat bakteri terpilih

Hasil pengujian aktivitas proteolitik menunjukkan *Bacillus sp.* RPH 2.3 aktif menghasilkan protease selama pertumbuhannya. Pada grafik (Gambar 2) 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.

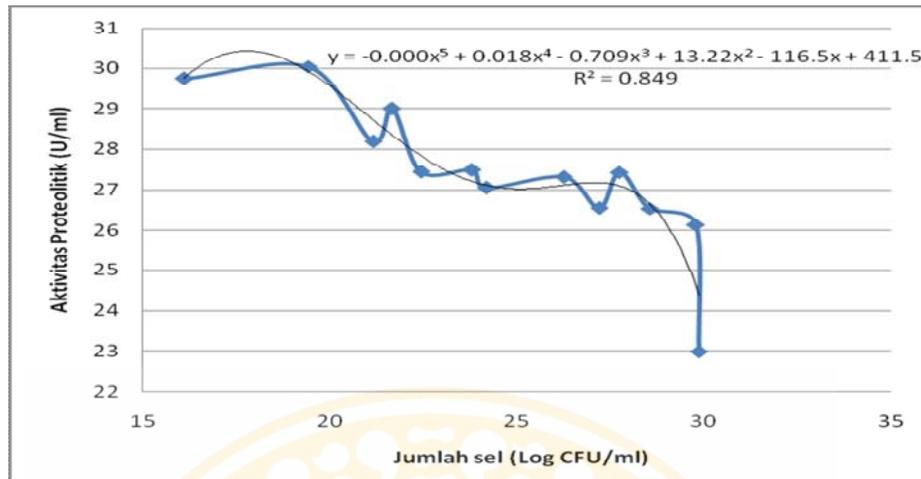


Gambar 2. Uji aktivitas proteolitik *Bacillus* sp. RPH 2.3 yang ditumbuhkan pada media *skim milk* selama 72 jam

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.



Gambar 3. Hubungan antara kurva pertumbuhan dengan uji aktivitas proteolitik *Bacillus* sp. RPH 2.3 pada waktu inkubasi 4 hingga 20 jam



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

Dari grafik 3 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 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).

### 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.

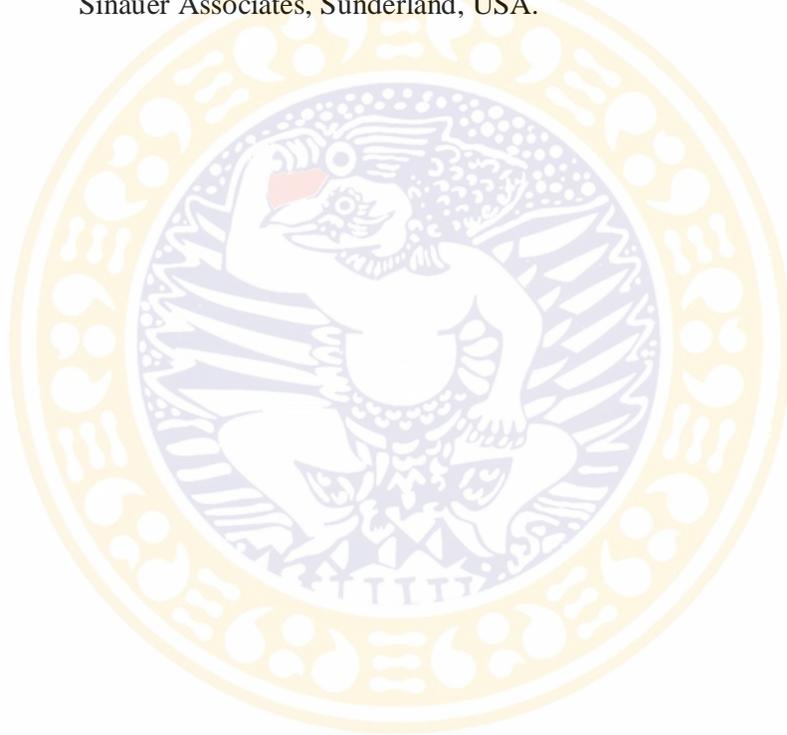
### Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan pada hasil isolasi dari limbah rumah pemotongan hewan didapatkan 5 isolat bakteri penghasil enzim protease yaitu isolat bakteri dengan kode isolat RPH 1.1, RPH 2.1, RPH 2.3, RPH 2.4, RPH 2.5. Dari kelima isolat bakteri yang memiliki nilai Indeks Proteolitik tertinggi adalah *Bacillus* sp. RPH 2.3 dengan persentase indeks kesamaan menggunakan koefisien sebanding sebesar 71% terhadap genus *Bacillus* ini memiliki kemampuan menghasilkan enzim protease sebesar 11,60 U/ml pada waktu inkubasi 20 jam.

### Daftar pustaka

- Adinarayana, K.P., Ellaiah, D.S., Prasad, 2003, Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease From A Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-II, AAPS. *Pharm. Sci. Tech.* **56** (4) : 1-9.
- Akhdiya, A., 2003, Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil, *Buletin Plasma Nutfah* **9** (2).
- Barrow. P. A., 1993, Probiotic for Chickens. In : Probiotics the Scientific Basis. R. Filler (Ed), Chapman and Hall. London.
- Enggel J, Meriandini A dan Natalia L., 2004, Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b, *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **9**(1): 9-12.
- Falch, E.A., 1991, Industrial Enzymes Developments in Production and Application, *Biotech. Adv.* **9**:643-658.
- Folin, O. and V.J. Ciocalteau, 1929, On Tyrosine and Tryptophan Determinations in Protein, *J. Biological Chemistry*, **73** : 627-650.

- Manitto, Paolo., 1992, *Biosintesis Produk Alami*, John Willey and Sons Inc, New York.
- Nascimento, W.C.A. and Martins, M.L.L., 2006, Studies on stability of protease from *Bacillus sp.* and its compatibility with commercial detergent, Brazilia, *Microbiol*, **37**: 307-311.
- Roihatin, A, 2006. Pengolahan Air Limbah Rumah Pemotongan Hewan (RPH) dengan Cara Elektrokoagulasi Aliran Kontinyu, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.
- Suhartono MT., 2000, Eksplorasi Protease Bakteri Asal Indonesia untuk Aplikasi Industri dan Riset Bioteknologi, *Prosiding Seminar Nasional Industri Enzim dan Bioteknologi II*. Hlm 125-133.
- Thomas DB., 1989, *A Textbook of Industrial Microbiology*, Second Edition, Sinauer Associates, Sunderland, USA.



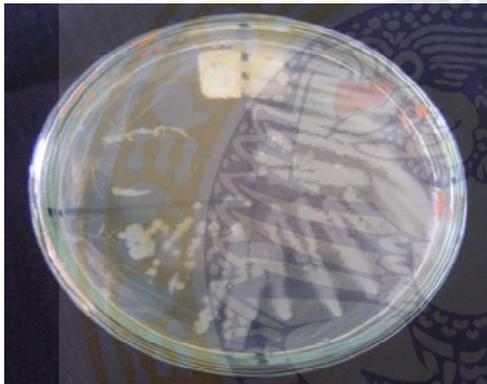
**Lampiran 2. Karakter Makroskopis Lima Isolat Bakteri Proteolitik Hasil Isolasi dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan Pacar Keling Surabaya**



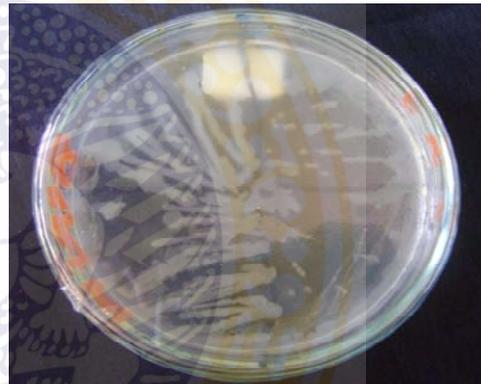
Isolat RPH 1.1



Isolat RPH 2.1



Isolat RPH 2.3

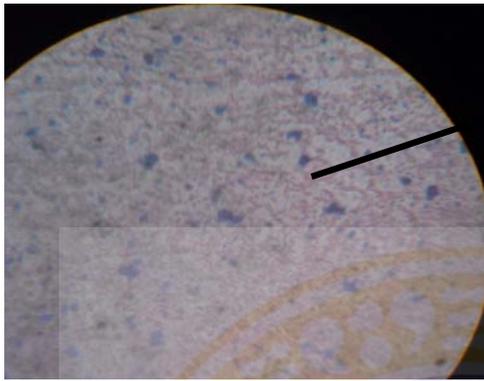


Isolat RPH 2.4

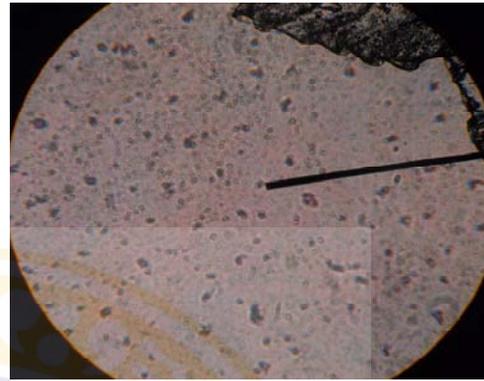


Isolat RPH 2.5

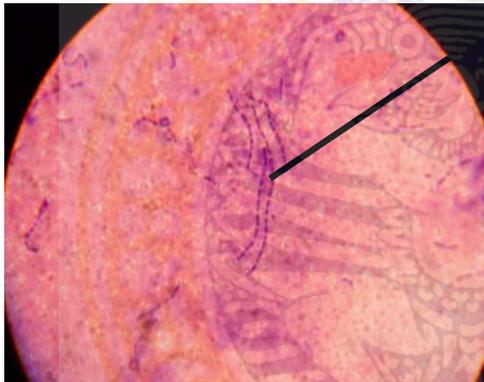
**Lampiran 3. Karakter Mikroskopis Lima Isolat Bakteri Proteolitik Hasil Isolasi dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan Pacar Keling Surabaya**



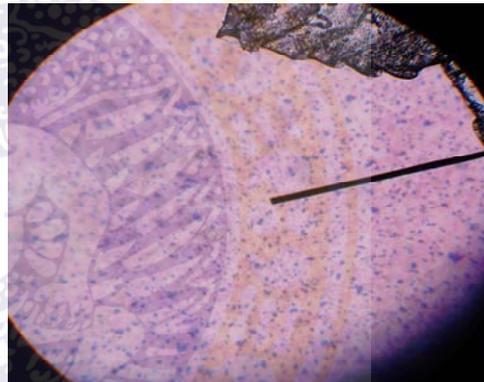
Isolat RPH 1.1



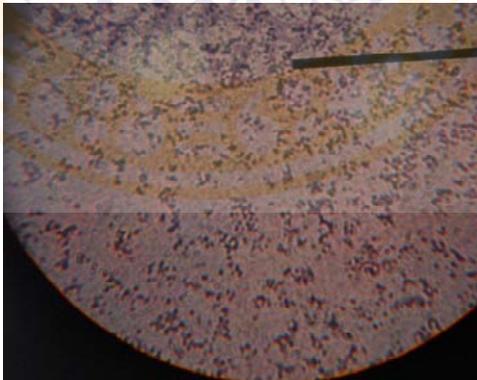
Isolat RPH 2.1



Isolat RPH 2.3

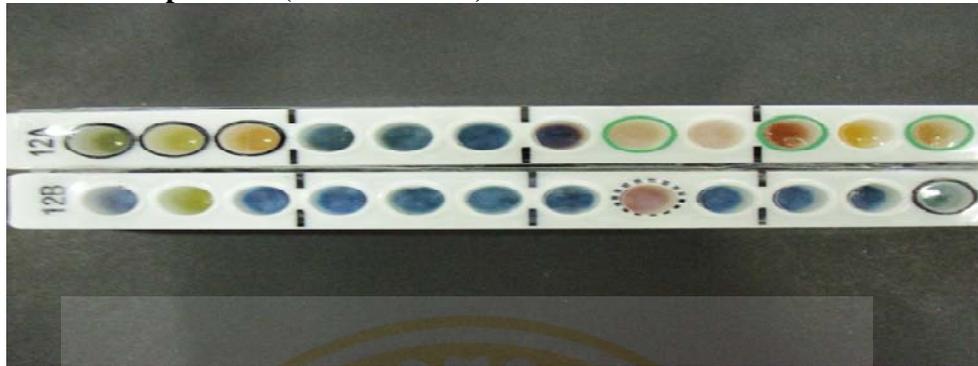


Isolat RPH 2.4



Isolat RPH 2.5

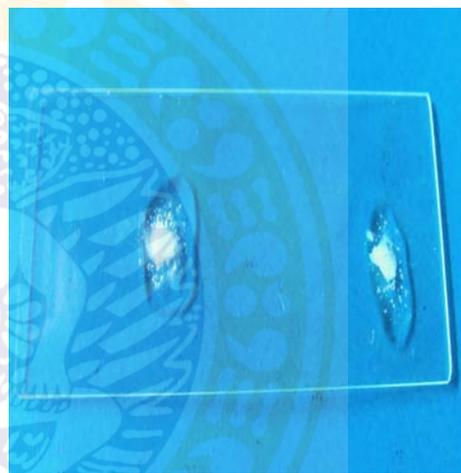
**Lampiran 4. Uji karakteristik fisiologis isolat bakteri terpilih penghasil protease (isolat RPH 2.3)**



Kit Microbact 12A dan 12B



Uji Oksidase



Uji Katalase



Uji Motilitas



Uji Amilase

**Lampiran 5. Hasil uji semi-kuantitatif aktivitas proteolitik pada lima isolat bakteri.**

No	Kode isolat	Diameter Koloni (mm)			Diameter Zona Bening (mm)			Indeks Hidrolisis			Rata-rata (mm)	Standar Deviasi
	Ulangan	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1	RPH 1.1	13,10	13,05	13,35	37,10	34,15	38,20	1,83	1,62	1,86	1,77	0,13
2	RPH 2.1	16,05	16,05	16,05	30,35	37,35	35,45	0,89	1,33	1,21	1,14	0,23
3	RPH 2.3	13,05	12,10	13,20	31,40	33,33	33,05	1,41	1,75	1,50	1,55	0,18
4	RPH 2.4	5,25	3,05	5,15	13,25	5,12	9,10	1,52	0,67	0,77	0,98	0,46
5	RPH 2.5	4,15	2,15	2,41	5,35	2,25	3,25	0,29	0,05	0,35	0,23	0,16

**Lampiran 6. Hasil log jumlah sel (CFU/ml) bakteri terpilih (isolat RPH 2.3) yang ditumbuhkan pada media *skim milk* selama 72 jam**

Inkubasi (Jam)	Jumlah Sel (CFU/ml)	Log Jumlah Sel (log CFU/ml)	Rata-rata Log Jumlah Sel (log CFU/ml)	Standar Deviasi	Waktu Generasi (menit)
0	$111 \times 10^3$	5,05	5,75	0,67	-
	$67 \times 10^4$	5,82			
	$25 \times 10^5$	6,39			
4	$166 \times 10^5$	7,22	7,94	0,64	28,2
	$142 \times 10^6$	8,15			
	$28 \times 10^7$	8,45			
8	$161 \times 10^6$	8,21	9,05	0,78	58,8
	$158 \times 10^7$	9,19			
	$58 \times 10^8$	9,76			
12	$161 \times 10^8$	10,21	11,10	0,92	33
	$114 \times 10^9$	11,06			
	$109 \times 10^{10}$	12,04			
16	$256 \times 10^{10}$	12,41	13,34	0,92	33
	$236 \times 10^{11}$	13,37			
	$177 \times 10^{12}$	14,25			
20	$207 \times 10^{11}$	13,32	14,14	0,82	99,6
	$139 \times 10^{12}$	14,14			
	$93 \times 10^{13}$	14,97			
24	$134 \times 10^{14}$	16,13	16,89	0,72	46,2
	$94 \times 10^{15}$	16,97			
	$37 \times 10^{16}$	17,57			
28	$316 \times 10^{16}$	18,50	19,15	0,66	220,2
	$134 \times 10^{17}$	19,13			
	$64 \times 10^{18}$	19,81			
32	$334 \times 10^{17}$	19,52	20,51	1,05	42
	$246 \times 10^{18}$	20,39			
	$403 \times 10^{19}$	21,61			
36	$138 \times 10^{18}$	20,14	21,11	0,99	140,4
	$119 \times 10^{19}$	21,08			
	$129 \times 10^{20}$	22,11			
40	$53 \times 10^{19}$	20,72	21,85	1,08	94,8
	$89 \times 10^{20}$	21,95			
	$74 \times 10^{21}$	22,87			
44	$109 \times 10^{20}$	22,04	23,22	1,10	53,4

	$243 \times 10^{21}$	23,39			
	$165 \times 10^{22}$	24,22			
48	$152 \times 10^{21}$	23,18	23,86	0,72	178,2
	$62 \times 10^{22}$	23,79			
	$41 \times 10^{23}$	24,61			
52	$74 \times 10^{23}$	24,87	25,77	0,91	35,4
	$58 \times 10^{24}$	25,76			
	$48 \times 10^{25}$	26,68			
56	$1139 \times 10^{23}$	26,06	26,81	0,78	76,8
	$573 \times 10^{24}$	26,76			
	$417 \times 10^{25}$	27,62			
60	$274 \times 10^{24}$	26,44	27,27	0,87	134,4
	$154 \times 10^{25}$	27,19			
	$151 \times 10^{26}$	28,18			
64	$162 \times 10^{25}$	27,21	28,10	0,88	89,4
	$132 \times 10^{26}$	28,12			
	$95 \times 10^{27}$	28,98			
68	$111 \times 10^{26}$	28,05	29,18	1,08	59,4
	$187 \times 10^{27}$	29,27			
	$162 \times 10^{28}$	30,21			
72	$131 \times 10^{27}$	29,12	29,57	0,62	819
	$20 \times 10^{28}$	29,30			
	$19 \times 10^{29}$	30,28			

**Lampiran 7. Hasil pengujian aktivitas proteolitik dari isolat bakteri terpilih (isolat RPH 2.3) yang ditumbuhkan pada media *skim milk* selama 72 jam**

Inkubasi (Jam)	Absorbansi	Absorbansi-Blanko	Konsentrasi Produk Hidrolisis	Aktivitas Proteolitik	pH
0	0,9623	Sebagai blanko	-	-	6,2
4	1,1531	0,1907	37,55	3,75	6,2
8	1,4041	0,4418	87,76	8,77	6,2
12	1,4752	0,5129	101,98	10,19	6,2
16	1,5352	0,5729	113,98	11,39	6,2
<b>20</b>	<b>1,5453</b>	<b>0,5830</b>	<b>116,00</b>	<b>11,60</b>	<b>6,5</b>
24	1,4897	0,5274	104,89	10,48	6,5
28	1,5044	0,5421	107,83	10,78	6,5
32	1,4124	0,4501	89,42	8,94	6,5
36	1,4528	0,4905	97,51	9,75	7
40	1,3750	0,4127	81,95	8,19	7
44	1,3770	0,4147	82,35	8,23	7
48	1,3551	0,3928	77,96	7,79	7
52	1,3687	0,4064	80,69	8,06	7
56	1,3304	0,3681	73,02	7,30	7
60	1,3743	0,4120	81,81	8,18	7
64	1,3296	0,3673	72,86	7,28	7
68	1,3097	0,3474	68,89	6,88	7
72	1,1524	0,1901	37,43	3,74	7

**Lampiran 8. Isolat bakteri RPH 2.3 pada uji protease positif (+)**

No	Jenis uji	RPH 2.3	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	19	20
1	Pewarnaan Gram	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d	d	d	-	-	d
2	Bentuk sel	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	bt	Bt
3	Sel yang membentuk rantai	+	+	+	+	+	d	+	+	d	d	d	d	d	d	-	-	-
4	Motilitas	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Bentuk dan ukuran spora	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VTX	TYX	VX	VX	VX	TY
6	Pembengkakan sel spora	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+
7	Pertumbuhan pada 10% NaCl	+	+	d	d	d	+	-	+	d	-	+	-	+	-	-	-	-
8	Uji produksi asam dari fermentasi karbohidrat : Glucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
9	Galactose	+	-	-	d	-	-	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-
10	Mannose	-	-	-	-	d	d	d	+	+	+	d	+	d	d	-	+	-
11	Raffinose	-	-	-	-	-	-	d	+	+	d	+	+	-	+	-	+	-
12	Salicin	-	-	+	d	d	-	+	+	+	+	+	d	d	d	-	+	-
13	Xylose	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	d	d	-	-	-	+	-

14	ONPG	-	-	-	d	-	d	+	+	+	+	d	d	d	d	d	+	-
15	Citrate	-	-	d	d	+	-	+	+	+	+	d	d	-	-	d	d	d
16	Urease	-	-	d	d	-	-	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-	d
17	Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
18	VP	-	+	+	+	+	-	-	+	+	d	+	d	d	+	-	+	-
19	Reduksi nitrate	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	d	d	-	d	+	d
20	Hidrolisis kasein (protein)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Hidrolisis tepung (amilum)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
22	Oksidase	+	d	d	d	d	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	+
23	Koefisien sebanding (%)		71	62	59	62	64	50	50	45	45	53	46	60	44	60	33	66

**Keterangan:**

(T) spora terminal; (V) spora sentral atau subterminal; (X) spora oval; (Y) spora bulat.

(1) *Bacillus anthracis*; (2) *Bacillus cereus*; *B.anthracooides*; (3) *Bacillus mycooides*; (4) *Bacillus thuringiensis*; (5) *Bacillus firmus*; (7) *Bacillus megaterium*; (8) *Bacillus pumilis*; (9) *Bacillus subtilis*; (10) *Bacillus licheniformis*; (11) *Bacillus amyloliquefaciens*; (12) *Bacillus coagulans*; (13) *Bacillus pantothenicus*; (14) *Bacillus alvei*; (15) *Bacillus brevis*; (19) *Bacillus polymyxa*; (20) *Bacillus sphaericus*

Lampiran 9. Tabel karakteristik fisiologis bakteri *Bacillus*

**Table 6.9a. Second-stage table for *Bacillus* species**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gram reaction ✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chains of cells ✓	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell length > 3µm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spore position and shape	VX																							
Swelling of cell body by spore	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Carbohydrates, acid from ASS:																								
--glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
cellulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
--ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
--Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
--VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
--Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippurate hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1) <i>Bacillus anthracis</i>																								
2) <i>Bacillus cereus</i> ; <i>B. anthracoides</i>																								
3) <i>Bacillus mycoides</i>																								
4) <i>Bacillus thuringiensis</i>																								
5) <i>Bacillus firmus</i>																								
6) <i>Bacillus lentus</i>																								
7) <i>Bacillus megaterium</i>																								
8) <i>Bacillus pumilus</i>																								
9) <i>Bacillus subtilis</i>																								
10) <i>Bacillus licheniformis</i>																								
11) <i>Bacillus arylolequifaciens</i>																								
12) <i>Bacillus coagulans</i>																								
13) <i>Bacillus pantothenicus</i>																								
14) <i>Bacillus alvei</i>																								
15) <i>Bacillus brevis</i>																								
16) <i>Bacillus circulans</i>																								
17) <i>Bacillus laterosporus</i>																								
18) <i>Bacillus macerans</i>																								
19) <i>Bacillus polymyxa</i>																								
20) <i>Bacillus sphaericus</i>																								
21) <i>Bacillus badius</i>																								
22) <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group I; Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).																								
23) <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group II; Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).																								
24) <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Group III; Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).																								

\* All motile species may produce non-motile variants  
T spore terminal  
V spore central/subterminal  
X spore oval (ellipsoidal)  
Y spore round ✓

Other symbols used in the table are explained in Tables 5.1 and 5.2 on p. 47.

Sumber: Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria Third Edition (Barrow *et al.*, 1993)

**Lampiran 10. Perhitungan persentase indeks kesamaan pada uji protease positif (Isolat RPH 2.3)**

	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	19	20
a	6	7	7	7	6	6	6	7	6	7	6	7	6	3	4	5
b	3	3	4	3	4	3	2	4	3	3	6	5	5	6	4	5
c	3	6	7	6	5	9	8	9	10	9	10	6	10	3	10	3
d	9	8	9	8	10	6	4	4	5	7	8	10	6	11	3	11
Ss (%)	71	63	59	63	64	50	50	46	46	54	47	61	44	61	33	67

Perhitungan persentase indeks kesamaan menggunakan koefisien sebanding (S<sub>s</sub>) mencakup kesamaan positif dan negatif dalam perhitungannya (Stanier *et al.*, 1986).

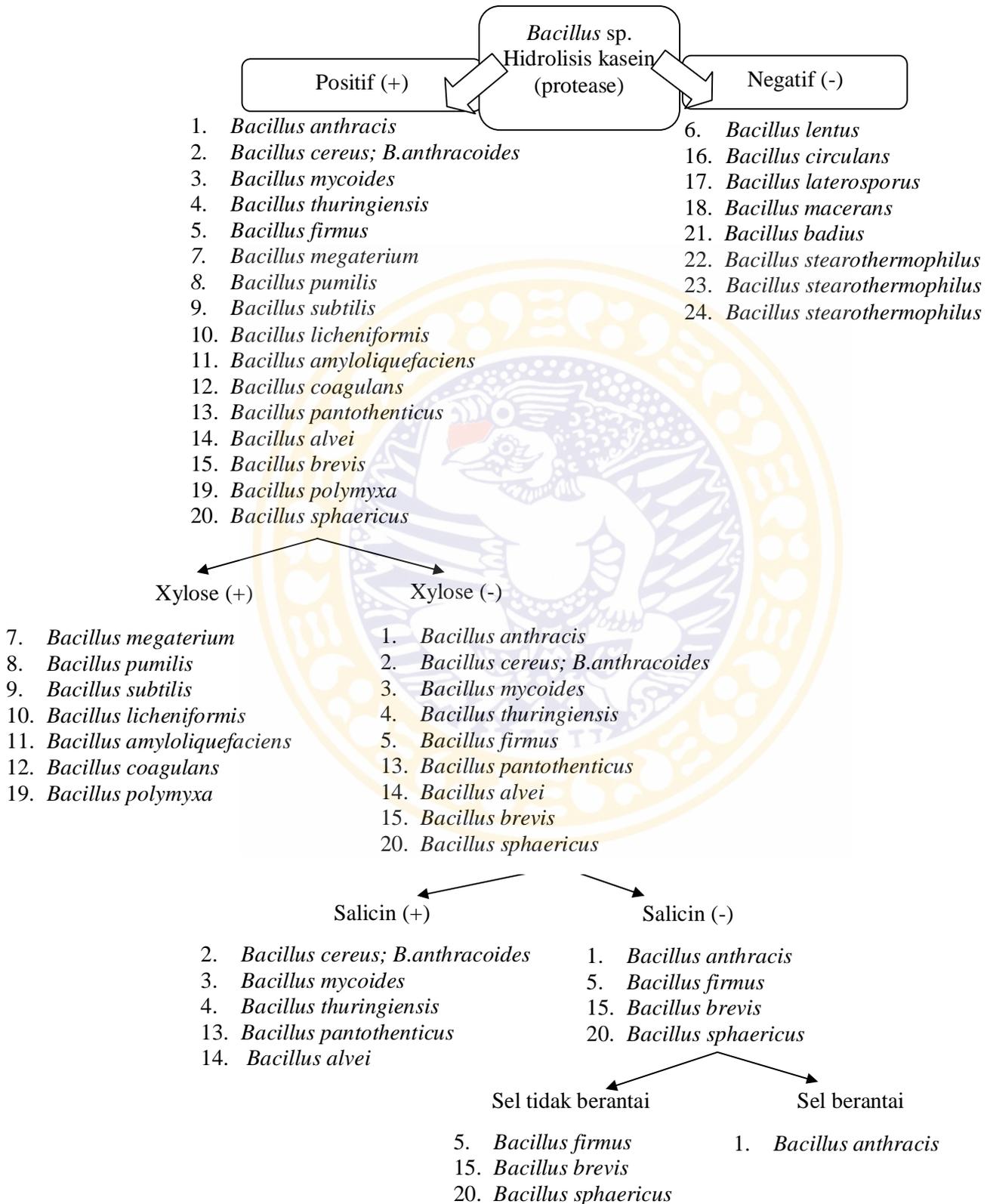
$$S_s = \frac{a+d}{a+b+c+d} \times 100\%$$

Keterangan:

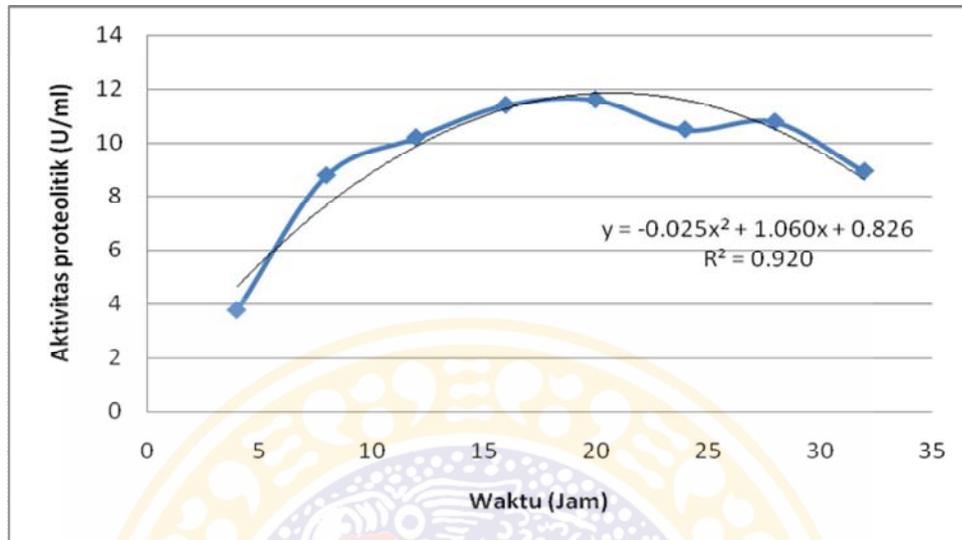
- S<sub>s</sub> : Koefisien sebanding
- a : Jumlah ciri positif pada kedua galur bakteri
- b : Jumlah ciri positif pada galur 1 dan negatif pada galur 2 bakteri
- c : Jumlah ciri negatif pada galur 1 dan positif pada galur 2 bakteri
- d : Jumlah ciri negatif pada kedua galur bakteri

Pada persentase koefisien sebanding (S<sub>s</sub>) menunjukkan bahwa karakter pada isolat RPH 2.3 memiliki kesamaan 71% dengan karakter yang dimiliki *Bacillus anthracis*.

**Lampiran 11. Pengelompokkan spesies *Bacillus* berdasarkan uji fisiologis**



### Lampiran 12. Perhitungan Titik Maksimum dari Grafik



$$-0.025x^2 + 1.060x + 0.826$$

$$0.826 + 1.06x - 0.025x^2$$

Solve [

$$\partial_x (-0.025x^2 + 1.060x + 0.826) = 0]$$

$$\{ \{ x = 21.2 \} \}$$

$$\partial_{x,x} (-0.025x^2 + 1.060x + 0.826)$$

$$-0.05$$

$$-0.025(21.2)^2 + 1.060(21.2) + 0.826$$

$$y = 12.062$$

Keterangan :

x = waktu inkubasi (jam)

y = aktivitas proteolitik (U/ml)

### Lampiran 13. Bahan-bahan Penelitian



- A. Nutrient Agar
- B. NaCl
- C.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$



- A.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- B.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- C.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- D.  $\text{FeCl}_3$
- E.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- F.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Media Bussnell Hass Cair



- A.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- B.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- C. Agar Powder
- D.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- E.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
- F.  $\text{FeCl}_3$
- G.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Media Bussnell Hass Agar



Susu Skim



Reagen Folin Ciocalteu

### Lampiran 14. Alat-alat penelitian



Colony Counter



Timbangan Analitik



Stirer



Waterbath



Incubator



Spektrofotometer



Autoclave



Sentrifugasi