

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI TERMO-PROTEOLITIK SUMBER
AIR PANAS SUNGAI MEDANG, SUNGAI PENUH, JAMBI

SKRIPSI SARJANA BIOLOGI

OLEH

DINA WAHYUNA

BP. 0810421001



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ANDALAS

PADANG, 2012

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termo-Proteolitik Sumber Air Panas Sungai
Medang, Sungai Penuh Jambi

Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains bidang studi Biologi

Oleh

Dina Wahyuna
BP.0810421001

Padang, Agustus 2012

Disetujui oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II

(Dr. Anthoni Agustien, MS)
NIP. 19620812198811001

(Dr. Phil.nat. Periadnadi)
NIP.195907251986031017

Skripsi ini telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang pada hari
Senin tanggal 6 Agustus 2012

No.	Nama	Jabatan	TandaTangan
1.	Dr. phil.nat. Nurmiati	Ketua	
2.	Dr. Anthoni Agustien	Sekretaris	
3.	Dr. phil.nat. Periadnadi	Anggota	
4.	Dr. Nasril Nasir	Anggota	
5.	Dr. Resti Rahayu	Anggota	

Niscaya Allah akan meninggikan orang – orang yang beriman diantaramu dan orang – orang yang berilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa – apa yang kamu kerjakan (Q.S. Al-Mujaadilah :11)

Alhamdulillahirobbil'alamin
Hari – hari penuh lika – liku dan rintangan sudah berhasil kulewati
Dunia terang kini sudah tergenggam dalam tanganku
Sebuah karya telah kugoreskan dalam perjalanan mencapai impianku
Setitik harapan kecil, semoga karyaku ini bermanfaat bagi khazanah ilmu pengetahuan

Dengan izinmu ya Robbi

Ku persembahkan karya kecil ini untuk keluargaku tercinta, sebagai bakti dan kasihku kepada Ibunda Rohana, S.Pd dan Ayahanda Zainuddin (alm) yang tak pernah henti – hentinya memberiku embun penyejuk hati, yang membuatku setegar karang diantara derasnya gelombang dan menerangiku tatkala redup

Untuk adek-adekku yang tersayang Mona Liza, Finaldi Eka Putra, Mei Adharniza & Fitriana niza kalian adalah penyemangatku dalam perjuangan ini. Kakak berharap kalian harus semangat dan rajin belajar. Dan semoga nanti kita semua sukses.....
Amin.....

Untuk keluarga besar ku terimakasih atas semua do'a dan dukungannya yang telah diberikan selama ini selama ini

Terimakasih kuhaturkan

Untuk sahabat Ku "Widia, Nadra, Dilla, Rina, Weni, Anna, Indah, Mida, Viona, Gita," Terima Kasih slalu ada disampingku, baik disaat suka maupun duka.

Untuk Tim Mikrobiologi "Uti, Uci, Devi, Elin, Iwat, Leni, Tika, Vz Syafda, Ami, Kak Rika, Kak Titik, Kak Alin, Bunda (Yusra), Kak Ayu, Kak Iyen," terimakasih atas hari – hari penuh perjuangan, indahny kenangan yang tercipta pada akhir – akhir perjuangan di Biologi membuat semuanya benar – benar terasa nyata

*Untuk Rhizanthess 08 bersama kalian telah kurajut hari – hari penuh suka dan duka
Kebersamaan kita kan jadi kenangan indah yang tak terlupakan*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji dan syukur hanya kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNya, sehingga penelitian dan penulisan Skripsi ini dapat selesai, sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan studi di jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian dalam mata ajaran Mikrobiologi dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termo-Proteolitik dari Sumber Air panas Sungai Medang, Sungai Penuh Jambi” .

Dengan selesainya skripsi ini penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Dr. Anthoni Agustien, MS dan Dr.phil.nat.Periadnadi selaku dosen pembimbing yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan dorongan kepada penulis mulai dari awal penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada :

1. Bapak Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, beserta karyawan.
2. Bapak Prof. Dr. Dahelmi, MS selaku penasehat akademik yang telah banyak membimbing penulis selama menjalani perkuliahan di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
3. Bapak Dr. Nasril Nasir selaku Kepala Laboratorium Riset Mikrobiologi serta Bapak / Ibu Kepala Laboratorium lainnya di lingkungan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

4. Bapak / Ibu staf dosen di lingkungan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Akhir kata penulis mengharapkan semoga skripsi ini bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan dapat dikembangkan untuk penelitian selanjutnya.

Padang, Juli 2012

Penulis

ABSTRAK

Penelitian tentang pengisolasian dan karakterisasi bakteri penghasil protease dari sumber air panas Sungai Medang telah dilakukan di Laboratorium Riset Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas pada bulan Maret sampai Juni 2012. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Hasil penelitian ini diperoleh 70 isolat bakteri, dimana 39 isolat bakteri menunjukkan sifat proteolitik. Isolat bakteri MI_{2,3} berasal dari lokasi I yang bersuhu 60⁰C memiliki nilai uji aktivitas tertinggi yaitu 13,592 U/ml. Isolat bakteri MI_{2,3} ini mempunyai karakter bersifat termoalkalifilik, kondisi pertumbuhan : suhu optimum 50⁰C; pH optimum 9,0, bersifat aerob dengan kemampuan menghasilkan amilase dan tidak mempunyai kemampuan untuk menghasilkan lipase dan selulase.

ABSTRACT

Study about Isolation and Characterization of Bacteria Thermoproteolytic from Hot Spring of Medang River has been done in Laboratory of Microbiology Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Andalas from March to June 2012. This study used descriptive method. The results of this study founded 70 isolates of bacteria with 39 isolates showed proteolytic character. The highest activity assay was showed by MI_{2,3} from first location with temperature of 60⁰C and with value is 13.592 U/ml. MI_{2,3} had thermoalkaliphilic character with growth conditions: optimum temperature of 50⁰C, optimum pH of 9.0, aerobic with ability to produce amylase and inability to produce lipase and cellulase.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
III. PELAKSANAAN PENELITIAN	9
3.1 waktu dan Tempat Penelitian.....	9
3.2 Metoda Penelitian	9
3.3 Alat dan Bahan	9
3.4 Pengambilan Sampel Air Panas	10
3.5 Cara Kerja	10

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Medium	10
3.5.2 Isolasi Bakteri Termofilik	10
3.5.3 Pembuatan Medium	11
3.5.4 Penapisan Bakteri Termofilik Penghasil Protease	12
3.5.5 Pemurnian Bakteri Termofilik	12
3.5.6 Uji Aktivitas Enzim	12
3.5.7 Karakterisasi Bakteri Termofilik	13
3.5.7.1 Pengamatan Makroskopis	13
3.5.7.2 Pewarnaan Gram	13
3.5.7.3 Pewarnaan Endospora	14
3.5.7.4 Suhu Pertumbuhan	14
3.5.7.5 pH Pertumbuhan	14
3.5.7.6 motilitas	14
3.5.8 Uji Enzimatik	14
3.5.9 Analisa Data	15
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Isolat bakteri termofilik penghasil enzim protease	16
4.2 Uji aktivitas enzim protease pada suhu 50 ⁰ C dengan pH 8	20
4.3 Karakterisasi parsial isolat MI _{2,3}	22
4.3.1 Bentuk mikroskopis dan makroskopis isolat MI _{2,3}	22
4.3.2 Pewarnaan Gram terhadap isolat MI _{2,3}	24
4.3.3 Suhu Pertumbuhan Optimum isolat MI _{2,3}	24
4.3.4 pH Pertumbuhan Optimum isolat MI _{2,3}	26
4.3.5 Uji enzimatik isolat MI _{2,3}	28
V. KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan	31

5.2	Saran	31
	DAFTAR PUSTAKA	32
	LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Indeks Proteolitik isolat bakteri sumber air panas Sungai Medang ...	18
2. Hasil uji aktivitas enzim Protease	20
4. Hasil rata – rata nilai Optical Densty pada perlakuan suhu	25
5. Hasil rata - rata pH pertumbuhan optimum.....	27
6. Uji enzimatik	29
7. Nilai absorbansi standar tirosin dengan menggunakan.....	43
8. Penentuan Persamaan Garis Regresi Larutan Standar Tirosin untuk berbagai konsentrasi.....	43
9. Penentuan koefisien korelasi.....	44

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Bentuk koloni bakteri MII _{2.1} yang membentuk zona bening dan mempunyai indeks proteolitik tertinggi	16
2. Habitat isolat MII _{2.1} sumber air panas Sungai Medang	20
3. Histogram aktivitas enzim protease	21
4. Bentuk motilitas isolat MI _{2.3}	23
5. Bentuk sel bakteri MI _{2.3}	24
6. Grafik suhu pertumbuhan isolat MI _{2.3}	26
7. Grafik pH pertumbuhan isolat MI _{2.3}	27
8. Uji enzimatik.....	30
9. Kurva standar tirosin	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Komposisi medium yang digunakan dalam penelitian	36
2. Alur kerja isolasi dan penapisan bakteri termofilik	37
3. Gambar isolat penghasil protease	39
4. Alur kerja isolasi enzim protease	40
5. Alur Kerja Uji aktivitas protease	41
6. Alur kerja pembuatan kurva standar Tirosin	42
7. Penentuan Persamaan Garis Regresi Larutan Standar Tirosin	43
8. Lokasi pengambilan sampel	45

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri termofilik merupakan mikroba yang potensial memproduksi enzim protease yang stabil terhadap panas dan dari sifat ini sangat diperlukan dalam industri pangan dan non pangan serta aplikasi bioteknologi karena mengurangi kemungkinan kontaminasi dan ekonomis. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, penggalian mikroorganisme indigenus penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia (Akhdia, 2003). Mikroorganisme ini sendiri tidak hanya bersifat toleran terhadap suhu lingkungannya yang bersifat ekstrim tetapi juga mampu untuk bertahan hidup dan berkembangbiak pada kondisi suhu yang ekstrim tersebut (Brock, 1986).

Mikroorganisme termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil. Enzim–enzim termostabil saat ini sedang mendapat perhatian besar, karena enzim–enzim ini sangat cocok untuk proses–proses industri yang memerlukan suhu tinggi (Rakshit, 2003). Enzim termostabil adalah enzim yang paling diinginkan oleh kebanyakan industri (Hewitt dan Solomon, 1996 *cit* Desriningsih, 2011), karena stabil dan aktif pada suhu yang lebih tinggi. Aplikasi enzim didalam bioteknologi semakin menuntut enzim yang bersifat tahan lingkungan. Karena faktor utama yang paling merusak enzim adalah suhu, maka usaha pertama yang akan dilakukan adalah mencari mikroba penghasil enzim-enzim termofilik dari berbagai sumber alam (Suhartono, 2000). Hal ini berkaitan dengan keuntungan yang akan diperoleh bila proses produksi dilakukan pada suhu tinggi, diantaranya adalah mengurangi kontaminasi, dan meningkatkan kecepatan transfer massa (Kamelia, Sidumarta dan Natalia. 2005).

Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, bir, dan limbah (Moon dan Parulekar 1993). Nilai perdagangan enzim dunia mencapai 3–4 miliar dolar per tahun, 4–5 juta dolar di antaranya dari pasar Indonesia yang keseluruhannya diimpor dari negara-negara produsen enzim (Rajasa 2003). Indonesia memiliki pasar yang luas dan sumber daya alam yang mendukung dengan keanekaragaman jenis bakteri penghasil protease, sehingga diharapkan impor protease dapat digantikan produksi protease dalam negeri.

Sumber air panas Semurup, Jambi mampu menghasilkan enzim protease yaitu didapatkan 50 isolat yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim protease setelah dilakukan isolasi terhadap bakteri tersebut. Sumber air panas Semurup mempunyai rentang suhu antara 50⁰C sampai 89⁰C dengan pH berkisar antara 3–7. Sekelilingnya didapati beberapa vegetasi seperti lumut, paku–pakuan, rumput–rumputan, selain itu juga ditemukan sisa organisme yang telah mati seperti daun–daunan, ranting–ranting kayu, serangga yang telah mati dan batu–batuan. Bakteri sumber air panas Semurup, Jambi ini selain menghasilkan protease mampu juga untuk menghasilkan amilase dan selulase. Suhu pertumbuhan optimumnya pada suhu 60⁰C dan pH pertumbuhan optimumnya pada pH 8 (Fitri, 2011).

Sumber air panas Sungai Medang merupakan salah satu sumber air panas yang berada di Kota Sungai Penuh, Provinsi Jambi. Berlokasi di Wisata Air Panas Sungai Medang, Kecamatan Air Hangat Timur, Kota Sungai Penuh. Sumber air panas tersebut memiliki suhu antara 50⁰C sampai 78⁰C, dengan interval pH 8,45 sampai 8,71 dan disekelilingnya didapati beberapa vegetasi seperti lumut, rumput–rumputan dan serasah–serasah. Selain itu juga ditemukan sisa–sisa organisme yang telah mati seperti daun–daunan, ranting–ranting kayu dan batu–batuan. Sumber air

panas ini terdiri dari 5 kolam, dengan kolam pertama memiliki 2 titik sumber air panas, kolam kedua mempunyai 3 titik sumber air panas, kolam ketiga, empat dan lima juga memiliki 2 titik sumber air panas. Dimana kolam kelima ini berlokasi dekat dengan perhotelan. Dengan adanya vegetasi tersebut kemungkinan akan didapatkan bakteri termofilik penghasil protease. Berdasarkan hal tersebut, maka akan dilakukan Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik Termofilik Dari Sumber Air Panas Sungai Medang.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah isolat bakteri termofilik asal Sumber Air Panas Sungai Medang mampu menghasilkan enzim protease?
2. Bagaimana karakter dari isolat bakteri termofilik Sumber Air Panas Sungai Medang?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk memperoleh isolat bakteri termofilik dari Sumber Air Panas Sungai Medang sebagai penghasil protease
2. Untuk mengetahui karakter isolat bakteri termofilik dari Sumber Air Panas Sungai Medang

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah menambah koleksi bakteri termofilik penghasil protease termostabil, diperolehnya karakter isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Sungai Medang serta memberikan sumbangsih kepada ilmu pengetahuan khususnya di bidang Mikrobiologi dan Enzimologi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroorganisme Termofilik

Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling banyak digunakan dibanding tanaman dan hewan karena memiliki beberapa keuntungan (Akhdia,2003). Ekstremofil merupakan organisme, yang pada umumnya mikroorganisme, dapat hidup dan bereproduksi pada kondisi – kondisi ekstrim seperti suhu, pH, tekanan, konsentrasi garam, tekanan, radiasi dan senyawa toksik (Eichler, 2001 *cit* Pakpahan 2009). Termofilik dan hipertermofilik adalah kelompok ekstremofilik yang paling banyak dipelajari. Termofilik adalah mikroorganisme yang menyukai suhu antara 45–80⁰C, sedangkan hipertermofilik adalah 113⁰C (Adam, 1999). Termofilik yang hidup pada suhu 60⁰C telah diketahui sejak lama, tetapi yang benar–benar termofilik yaitu yang dapat hidup pada suhu yang lebih tinggi, pertama kali ditemukan sekitar 30 tahun yang lalu.

Mikroorganisme 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 habitat yang tersebar luas di muka bumi. Beberapa habitat tersebut dapat dibedakan menjadi dua bagian yaitu habitat nonvulkanik dan habitat vulkanik. Habitat vulkanik dengan kisaran suhu 40 – 70⁰C, 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 *cit* Agustien, 2010). Habitat vulkanik memiliki suhu lebih

tinggi daripada 70⁰C. Lingkungan ekstrim suhu tinggi di alam ada di area panas bumi yang berhubungan dengan kegiatan tektonik seperti sumber air, daerah solfatara, kawah gunung berapi dan hidrotermal laut dalam (Madigan *et al.*, 2000).

Mikroorganisme termofilik merupakan contoh mikroba yang prospektif dalam aplikasi bidang pangan dan industri. Salah satu penerapan yang telah dilakukan adalah sebagai agen aktif dalam fermentasi bersuhu tinggi, proses pengolahan limbah dan proses pelarutan mineral (Lestari, 2000). Mikroorganisme termofilik dibagi atas 3 kelompok berdasarkan suhu pertumbuhannya, yaitu : a) Termofilik Fakultatif, memiliki suhu maksimum antara 50⁰C sampai pada suhu 65⁰C dan tidak dapat tumbuh pada suhu di bawah 30⁰C, contoh kelompok ini antara lain *Bacillus coagulans* dan beberapa strain *Bacillus stearothermophilus*. b) Termofilik obligat, memiliki suhu maksimum 65⁰C sampai 70⁰C dan tidak dapat hidup di bawah suhu 40⁰C sampai 42⁰C. Contoh kelompok ini adalah beberapa strain *Bacillus stearothermophilus*. c) Termofilik ekstrem, memiliki suhu maksimum lebih dari 70⁰C dengan suhu optimum lebih besar dari 65⁰C dan suhu minimum lebih dari 40⁰C. Contohnya *Bacillus caldolyticus* dan *Thermus thermophilus* (Friedman, 1992).

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). Kebanyakan mikroorganisme memiliki kemampuan untuk mengubah komposisi membran sel jika berada pada lingkungan ekstrim. Kandungan membran sel berupa lipid memegang peranan penting dalam adaptasi terhadap suhu tinggi. mikroorganisme termofilik memiliki membran sitoplasma yang kaya akan asam lemak jenuh, menyebabkan membran stabil dan efektif pada suhu tinggi (Rilfors *et al.*, 1978 *cit* Agustien, 2010).

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).

2.2 Enzim

Enzim adalah kelompok protein yang berperan penting dalam aktifitas biologi. Enzim berfungsi sebagai katalisator di dalam sel dan sifatnya sangat khas. Dalam jumlah yang kecil enzim dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan hasil reaksi. Karena enzim mengkatalisis reaksi – reaksi di dalam sistem biologis, maka enzim disebut sebagai biokatalisator (Murray, 2003 *cit* Dewi, 2008).

Menurut Lechniger (1988) enzim disintesa oleh sel hidup untuk mengkatalisa reaksi yang berlangsung didalamnya. Hal ini berfungsi sebagai biokatalisator yang berperan mengkatalisis reaksi – reaksi spesifik karena mempunyai aktifitas katalitik. Enzim dapat mempercepat reaksi kimia 10^6 kali dibandingkan dengan reaksi yang terjadi spontan (Pelczer & Chan, 1986 *cit* Setiani 2008).

Enzim dapat dibedakan menjadi dua yaitu enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler. Enzim intraseluler adalah enzim yang diproduksi oleh sel dan melakukan reaksi di dalam sel. Sedangkan enzim ekstraseluler adalah enzim yang diproduksi di dalam sel dan dikeluarkan dari sel ke substrat disekelilingnya, dimana enzim ini akan menghidrolisis makromolekul di luar sel menjadi komponen yang lebih larut sehingga dapat diserap ke dalam sel dengan sistem transpor tertentu.

Komponen – komponen molekul tersebut pada umumnya digunakan sebagai sumber karbon dan energi (Fardiaz, 1994).

2.3 Enzim Termotabil

Termofilik merupakan sumber–sumber enzim yang unik dengan sifat tahanterhadap suhu tinggi yang dikenal dengan enzim termotabil (Dirnawan *et al.*, 2000). Enzim termotabil adalah enzim yang suhu aktivitas maksimumnya di atas suhu pertumbuhan mikroorganisme penghasilnya. Enzim termotabil memiliki mekanisme katalitik yang sama dengan enzim mesofilik padanya. Namun sifat ketahanan terhadap suhu menyebabkan enzim termotabil memiliki nilai komersial yang sangat tinggi (Gerday *et al.*, 2000).

Eksplorasi mikroba termofilik yang potensial penghasil enzim termotabil telah dilakukan di beberapa wilayah di Indonesia. Purwadaria T., A. Suwanto & H. Dirnawan. (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. Enzim protease termotabil dan mikroorganisme yang menghasilkannya juga berhasil dipelajari berbagai sumber air panas. Protease termotabil yang mempunyai aktivitas optimal pada suhu 65⁰C dihasilkan oleh isolat SP3 yang diisolasi dari sumber air panas Sipholon Tapanuli Utara Sumatera Utara (Pakpahan, 2009).

2.4 Enzim Protease

Enzim protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi asam amino. Masing – masing protease mempunyai pengikat peptida yang spesifik. Enzim ini diperoleh dari tumbuhan dan mikroorganisme. Sifat proteolitik didasarkan pada

kemampuan untuk memutus ikatan peptida protein. (Suhartono, 1989). Menurut Sumaryanto, (1997) berdasarkan pH optimum untuk aktifnya enzim protease dibedakan atas 3 kelompok yaitu protease alkali, protease netral dan protease asam.

Protease merupakan enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisiko – kimia dan 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 sudah 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 disekelilingnya, tanpa induksi enzim tetap diproduksi tetapi dalam jumlah kecil (Fardiaz, 1987).

Protease ekstraseluler sebagian besar berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik intraseluler memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Seperti mengganti protein, memelihara keseimbangan antara degradasi dan sintesis protein. Protease intraseluler berperan dalam fungsi fisiologi lainnya, seperti pencernaan, maturasi hormon, perakitan virus, respon imun, inflamasi, fertilisasi, koagulasi darah, fibrinolisis, kontrol tekanan darah, sporulasi, germinasi dan patogenesis (Rao *et al.* 1998 *cit* Pakpahan, 2009).

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, Larriche & Pandey. 2006).

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2012 di Laboratorium Riset Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dengan menggunakan beberapa tahap isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Sungai Medang dan selanjutnya dilakukan penapisan bakteri yang bersifat proteolitik.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, gelas ukur erlenmeyer, cawan petri, gelas piala, pipet tetes, magnetik stirer, hotplate, jarum ose, autoklaf, shaker, lampu spiritus, timbangan analitik, inkubator, sinar UV.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel air panas yang berasal dari sumber air panas Sungai Medang, kota Sungai penuh, Jambi, Medium Nutrien Agar, (NA), Medium Susu Skim, Medium Pati Agar, Medium CMC (Carboksil Metil Selulosa), alkohol, aquades, minyak zaitun, rhodomin B, lugol, alumanium foil, kapas, kain kasa, tissue, K_2HPO_4 , congo red, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, NaCl, Casein Hammarsten, TCA, Na_2CO_3 .

3.4 Pengambilan Sampel Air Panas

Pengambilan sampel air dilakukan di sumber air panas Sungai Medang, Jambi secara purposive sampling. Sampel air diambil dengan menggunakan botol steril 100 ml pada 10 cm dibawah permukaan air yang bersuhu antara 50⁰C - 78⁰C selanjutnya sampel disimpan pada wadah dan dibawa segera ke laboratorium sebelum 12 jam (Lamp 8).

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Sterilisasi alat dan medium

Alat – alat yang digunakan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama lebih kurang 15 menit. Setelah itu medium yang digunakan dihomogenkan terlebih dahulu melalui pemanasan, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama lebih kurang 15 menit.

3.5.2 Isolasi Bakteri Termofilik

Sampel dalam botol dikocok agar homogen, kemudian diambil 1 ml ditetaskan ke dalam cawan petri yang berisi medium NA. Selanjutnya cawan petri digoyang – goyang agar suspensi rata dalam medium. Setelah membeku diinkubasi pada suhu tumbuh 50⁰C selama 24 – 48 jam, sehingga ada terlihat koloni – koloni bakteri yang tumbuh. Koloni – koloni yang tumbuh pada medium NA diinokulasikan kembali pada cawan petri steril yang berisi medium NA secara pengggoresan dengan metode kuadran. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 50⁰C selama 24 – 48 jam sampai terlihat koloni – koloni tunggal yang tumbuh (Atlas, 1997) (Lamp 2).

3.5.3 Pembuatan Medium

3.5.3.1 Pembuatan Medium Nutrien Agar

Medium NA instan sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam becker glass yang berisi 1000 ml aquades. Kemudian dipanaskan diatas hotplate, dihomogenkan dengan bantuan stirer. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Bonang dan Koeswardono) (Lamp 1).

3.5.3.2 Pembuatan Medium Susu Skim

Masukkan Susu Skim 20 g dan Bacto Agar 15 g ke dalam beker glass yang berisi 1000 ml aquades. Kemudian dipanaskan diatas hot plate, dihomogenkan dengan bantuan magnetik stirer. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf 121⁰C selama 15 menit (Agustien, 2010) (Lamp 1).

3.5.3.3 Pembuatan Medium Pati Agar

Medium ini dibuat dengan melarutkan 2 g pati (amilum) dan 15 g Bacto Agar dalam 1 liter aquadest, lalu dipanaskan hingga homogen. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Lay, 1994).

3.5.3.4 Pembuatan Medium Agar Lipid

Medium dibuat dengan melarutkan 15 gr agar dengan minyak Zaitun 2% dan Rodamin b 1% dalam 1 liter aquades, lalu dipanaskan hingga homogen. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada 121⁰C tekanan 15 lbs selama 15 menit (Lay, 1994).

3.5.4 Penapisan Bakteri Termofilik Penghasil protease

Penapisan bakteri termofilik ini dilakukan menurut modifikasi dan metode Benerjee *et.,al* (1999). Biakan miring bakteri termofilik ini diinokulasikan dengan menggunakan tusuk gigi steril pada medium susu skim. Kemudian diinkubasi pada suhu 50⁰C selama 24 – 48 jam. Koloni bakteri dan zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri diukur diameternya dan selanjutnya ditentukan Indeks Proteolitik (IP) (Lamp.1) :

$$IP = \frac{\text{diameter zona bening} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}}$$

Dicatat isolat yang mempunyai IP yang paling tinggi

3.5.5 Pemurnian Bakteri Termofilik

Biakan bakteri termofilik digoreskan pada medium susu skim. Biakan diinkubasi pada suhu 50⁰C selama 24. Koloni tunggal diinokulasikan pada biakan miring susu skim dan diinkubasi pada suhu 50⁰C dalam inkubator selama 24 jam, kemudian disimpan sebagai stok bakteri (Atlas, 1997).

3.5.6 Uji Aktivitas Enzim

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). 1 ml substrat kemudian direaksikan dengan 1 ml enzim selama 10 menit pada suhu 50 ⁰C. reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml asam tricloro asetat (TCA) 10 % inkubasi selama 10 menit pada suhu 50 ⁰C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Pada 1 ml supernatan ditambahkan Na₂CO₃ 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) (Lamp. 5).

3.5.7 Karakterisasi Bakteri Termofilik

Karakterisasi bakteri termofilik dilakukan pada isolat bakteri yang memiliki IP yang paling tinggi.

3.5.7.1 Pengamatan makroskopis meliputi

Bentuk koloni, ukuran koloni, pinggir koloni, warna koloni, permukaan koloni (licin atau kasar)

3.5.7.2 Pewarnaan Gram

Dibersihkan objek glass dengan alkohol hingga bebas lemak, kemudian difiksasi diatas nyala lampu spritus. Diteteskan suspensi bakteri diatas kaca objek, kemudian difiksasi diatas lampu spritus. Diteteskan kristal violet 1 – 2 tetes selama 1 sampai 2 menit dan dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan. Kemudian diteteskan larutan lugol 1 – 2 tetes1 sampai 2menit dan dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan. Selanjutnya diteteskan alkohol 70% 1- 2 tetes selama 30 detik dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Ditetesi safranin 1 – 2 tetes selama 1 sampai 2 menit, kering anginkan dan diamati dibawah mikroskop (Fardiaz, 1993).

3.5.7.3 Pewarnaan Spora

Dibuat preparat oles kemudian diberi larutan hijau malakit. Dipanaskan preparat selama 5 menit sehingga terlihat uap. Setelah preparat dingin dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya diwarnai dengan safranin selama 1 menit. Dikering anginkan dan diamati (Lay,1994).

3.5.7.4 Suhu Pertumbuhan

Isolat bakteri termofilik diinokulasikan kedalam medium pepton pada suhu pertumbuhan yaitu 30⁰C, 45⁰C, 50⁰C, 60⁰C, 70⁰C,80⁰C, 90⁰C sebanyak 1 ose setiap suhunya. Lalu inkubasi selama 24 jam dan diukur kekeruhannya dengan spektrofotometer pada A600 nm (Agustien, 2010).

3.5.7.5 pH Pertumbuhan

Isolat bakteri termofilik diinokulasikan ke medium pepton pada pH pertumbuhan yaitu 7, 8, 9, 10 sebanyak 1 ose setiap pHnya. Lalu diinkubasi selama 24 jam dan dikur kekeruhannya dengan spektrofotometer pada A600 nm (Agustien, 2010).

3.5.7.6 Motilitas

Isolat bakteri termofilik diinokulasikan pada medium Nutrien Agar semi solid (agar ± 0,7%). Inkubasi pada suhu optimum dan diamati pertumbuhan bakteri (Lay, 1994).

3.5.8 Uji Enzimatik

3.5.8.1 Uji Amilase

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

3.5.8.2 Uji Selulase

Isolat bakteri diinokulasikan ke medium CMC 1 %, lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 60⁰C cawan petri ditetesi Congo Red, jika terbentuk zona bening maka dapat diindikasikan bakteri menghasilkan selulase (Lay, 1994).

3.5.8.4 Uji Lipase

Isolat bakteri diinokulasikan ke medium NA + minyak Zaitun, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 60⁰C jika terbentuk butiran hijau maka dapat diindikasikan bakteri menghasilkan lipase (lay, 1994).

3.5.9 Analisa Data

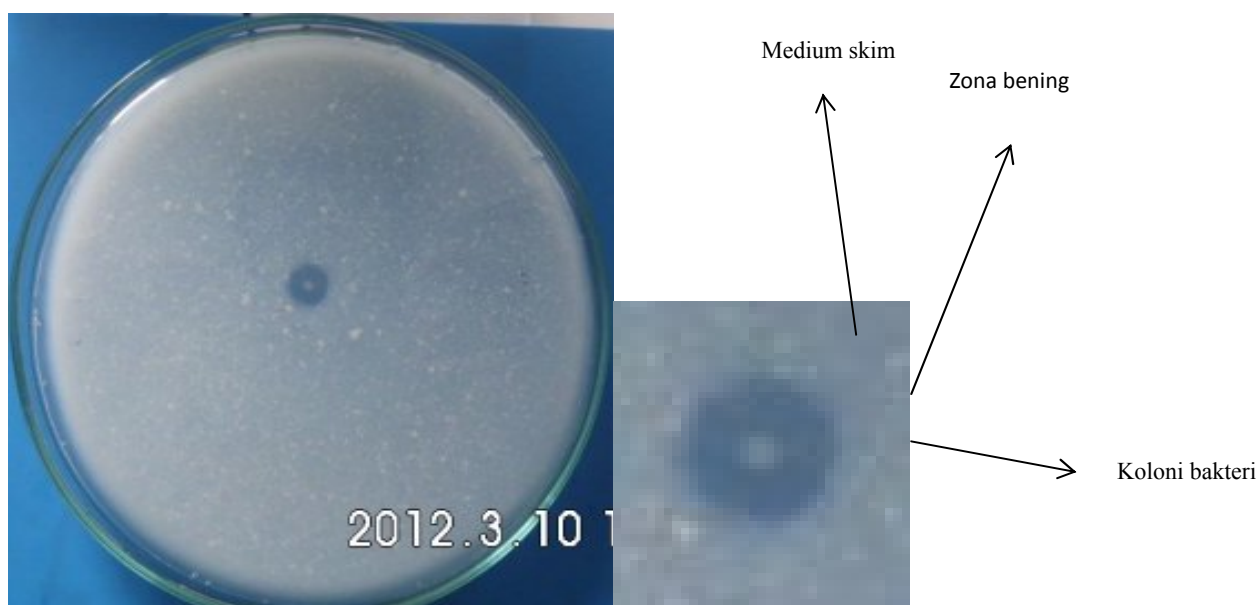
Adapun parameter yang dianalisa adalah karakter yang diperoleh dari pengamatan mikroskopik dan makroskopik, uji aktifitas dan uji enzimatik.

IV.HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang telah dilakukan tentang isolasi dan karakterisasi dari bakteri termofilik asal sumber air panas Sungai Medang, didapatkan hasil sebagai berikut :

4.1 Isolat bakteri Termofilik penghasil Enzim Protease

Sumber air panas ini terletak di daerah wisata air panas Sungai Medang, Kecamatan Air Hangat Timur, Kota Sungai Penuh. Sampel sumber air panas ini diambil dari 5 kolam. Suhu dari sumber air panas ini berkisar antara 50⁰C sampai 78⁰C dan rentang pH berkisar antara 8,45 sampai 8,71. Hasil isolasi menunjukkan diperolehnya 70 koloni bakteri termofilik. Setelah dilakukan uji proteolitik diperoleh 39 isolat bakteri penghasil protease yang memiliki IP antara 0,13 sampai 7,89 mm (Tabel 1) . Hal ini ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni yang tumbuh pada medium Skim Agar. Bentuk koloni bakteri dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bentuk koloni bakteri MII_{2,1} yang membentuk zona bening dan mempunyai indeks proteolitik tertinggi

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 kaseinat. 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.

Kisaran nilai indeks proteolitik yang dihasilkan 39 isolat yang potensial penghasil protease berkisar antara 0,13 sampai 7,89. Isolat yang memiliki nilai indeks proteolitik yang tertinggi terdapat pada isolat MII_{2.1} yaitu 7,89 yang di dapatkan pada lokasi II pada titik ke 2 dengan suhu 77⁰C dan pada pH 8,71. Isolat yang mempunyai indeks proteolitik terendah terdapat pada isolat MV_{1.10} yaitu sebesar 0,13 yang lokasinya terletak pada kolam V di titik 1 dengan suhu 74⁰C dengan pH 8,55 (tabel 1). Pada Tabel 1 dapat juga dilihat bahwa 7 isolat memiliki indeks proteolitik lebih dari 2 yaitu 7,89 pada isolat MII_{2.1}, 4,75 pada isolat MII_{1.18}, 4,5 pada isolat MI_{2.3}, 4,25 pada isolat MII_{3.21}, 4,22 pada isolat MV_{1.5}, 4,015 pada isolat MV_{2.4} dan 3,143 pada isolat MIII_{1.1}. Fitri (2011) melaporkan bahwa ditemukan 20 isolat penghasil enzim protease pada sumber air panas semurup Jambi dengan indeks proteolitik diatas 2 memiliki diameter koloni 0,1 sampai 0,9.

Tabel 1. menunjukkan 39 isolat proteolitik memiliki Indeks Proteolitik (IP) berkisar antara 0,13 sampai dengan 7,89.

Tabel 1. Indeks Proteolitik isolat bakteri sumber air panas Sungai Medang

No.	Kolam	Suhu	Kode Isolat	Hasil		Indeks Proteolitik (IP)
				Diameter Koloni	Diameter Zona Bening	
1.	I	78 ⁰ C	MI _{2,3}	0,6	3,3	4,5
2.			MI _{2,4}	9,3	14,6	0,57
3.			MI _{2,9}	7,2	16,5	1,22
4.			MI _{2,10}	7	19,7	1,81
5.	II	52 ⁰ C	MII _{1,2}	6,4	8,3	0,297
6.			MII _{1,10}	4,8	11,6	1,417
7.			MII _{1,11}	8,75	10,45	0,194
8.			MII _{1,13}	2,2	6,0	1,727
9.			MII _{1,18}	0,8	4,6	4,75
10.			MII _{1,16}	3,65	10,4	1,85
11.		77 ⁰ C	MII _{2,1}	1,8	16,6	7,89
12.			MII _{2,2}	15,1	17,74	0,175
13.		70 ⁰ C	MII _{3,16}	21,1	24,35	0,154
14.			MII _{3,21}	2,4	12,6	4,25
15.	MII _{3,23}		9,6	14,05	0,464	
16.	III	50 ⁰ C	MIII _{1,1}	1,4	5,8	3,143
17.			MIII _{1,2}	4	8,8	1,2
18.			MIII _{1,3}	3,9	7,9	1,026
19.			MIII _{1,4}	4,4	11,4	1,591
20.			MIII _{1,5}	3,9	7,5	0,923
21.			MIII _{1,6}	5,7	14,3	1,509
22.			MIII _{1,7}	5,5	9,2	0,673
23.			MIII _{1,8}	7,1	13,7	0,93
24.	IV	70 ⁰ C	MIV _{1,7}	5,2	7,7	0,455
25.			MIV _{1,8}	8,7	10,85	0,247
26.			MIV _{1,9}	6,0	12,1	1,017
27.	V	74 ⁰ C	MV _{1,1}	8,15	9,7	0,190
28.			MV _{1,5}	0,9	4,7	4,22
29.			MV _{1,6}	1,4	4,1	1,929
30.			MV _{1,7}	4,5	7,3	0,622
31.			MV _{1,8}	9,42	17,45	0,852
32.			MV _{1,10}	5,4	6,1	0,13
33.		74 ⁰ C	MV _{2,2}	2,7	5,3	0,963
34.			MV _{2,3}	15,1	18	0,192
35.			MV _{2,4}	2,02	10,13	4,015
36.			MV _{2,6}	6	11	0,83
37.	MV _{2,7}		4,4	6,1	0,387	
38.	MV _{2,8}		8,6	12,35	0,436	
39.	MV _{2,10}		2,7	5,6	1,074	

Dapat juga dilihat pada Tabel 1 bahwa isolat bakteri termofilik yang mampu menghasilkan protease, hidup pada kondisi lingkungan dengan suhu 50⁰C sampai 78⁰C, 4 isolat hidup pada kondisi lingkungan bersuhu 78⁰C dengan pH 8,45, 2 isolat hidup pada kondisi lingkungan bersuhu 77⁰C dengan pH 8,71, 14 isolat hidup pada kondisi lingkungan bersuhu 50⁰C dengan pH 8,62 dan 8,57, 6 isolat hidup pada kondisi lingkungan bersuhu 70⁰C dengan pH 8,54 dan 8,57, 13 isolat hidup pada kondisi lingkungan bersuhu 74⁰C dengan pH 8,55 dan 8,59.

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). Brock (1986) menyatakan bahwa mikroorganisme termofilik mempunyai 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 panas.

Habitat isolat bakteri MII_{2,1} yang memiliki indeks proteolitik tertinggi pada lokasi II yang bersuhu 77⁰C. Sumber air panas tempat hidup isolat bakteri tersebut dikelilingi oleh rumput-rumputan, serasah dan tanaman lainnya, seperti pada gambar 2. Adanya faktor biotik yang didukung oleh faktor suhu dan pH memungkinkan bakteri tersebut dapat hidup. Menurut Dirnawan, Suwanto, dan Purwadaria (2000). Adanya biotik disekitar kolam mendukung akan terdapatnya bakteri termofilik. Daun-daun yang gugur, ranting dahan, biji rerumputan, serbuk sari, dan bangkai serangga yang terdapat dalam sumber air panas merupakan bahan organik yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme yang hidup dalam sumber air panas.



Gambar 2. Habitat isolat MII_{2,1} sumber air panas Sungai Medang

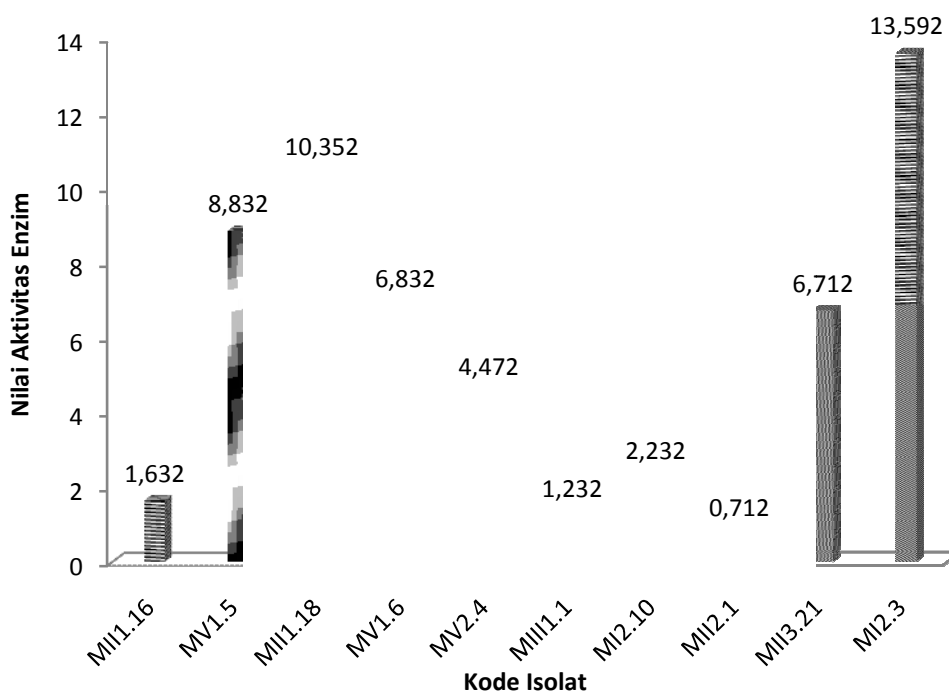
4.2 Uji aktivitas enzim Protease pada suhu 50⁰C dengan pH 8

Pengujian aktivitas enzim dilakukan terhadap 10 isolat yang memiliki indeks proteolitik teratas seperti yang disajikan pada Tabel 2. Isolat yang memiliki indeks proteolitik tinggi diuji aktivitasnya pada suhu 50⁰C dengan pH 8. Suhu 50⁰C merupakan suhu optimum bagi bakteri termofilik dan bakteri ini merupakan bakteri yang mampu hidup pada pH basa, maka dilakukan pengujian aktivitas enzim pada pH 8.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas enzim Protease setelah diregresikan dengan standar tirosin

No.	Kode Isolat	Indeks Proteolitik (IP)	Aktivitas Enzim (U/ml)
1.	MII _{2,1}	7,89	0,712
2.	MII _{1,18}	4,75	10,352
3.	MI _{2,3}	4,50	13,592
4.	MII _{3,21}	4,25	6,712
5.	MV _{1,5}	4,22	8,832
6.	MV _{2,4}	4,02	4,472
7.	MIII _{1,1}	3,14	1,232
8.	MV _{1,6}	1,93	6,832
9.	MII _{1,16}	1,85	1,632
10.	MI _{2,10}	1,81	2,232

Tabel 2 menunjukkan bahwa isolat yang memiliki aktivitas enzim yang tertinggi adalah pada isolat MI_{2,3} yaitu 13,592 U/ml dan yang paling rendah adalah pada isolat MII_{2,1} yaitu 0,712 U/ml. Menurut Pakpahan (2009) hasil pengujian aktivitas protease menunjukkan isolat SP3 memiliki aktivitas protease secara kuantitatif yang tertinggi sebesar 11,6 Unit sedangkan aktivitas protease terendah dihasilkan oleh isolat SP1 sebesar 9,50 Unit. Isolat SP2 dengan hidrolisis tertinggi secara kualitatif sebesar 5,96 mm hanya menghasilkan aktivitas enzim secara kuantitatif sebesar 9,93 Unit, sedang SP3 dengan aktivitas hidrolisis terendah sebesar 5,22 mm, memperlihatkan aktivitas yang lebih tinggi dari SP2. Histogram uji aktivitas enzim protease dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Histogram Aktivitas Enzim Protease (U/ml)

Adanya aktivitas enzim yang berbeda nilainya setiap isolat, hal ini kemungkinan disebabkan oleh enzim yang dihasilkan setiap jenis mikroorganisme yang berbeda akan menghasilkan enzim yang berbeda jumlah dan urutan asam amino

pembentuk enzim tersebut. Suhartono (1991) menyatakan bahwa aktivitas dari enzim protease dari mikroorganisme dipengaruhi oleh jumlah enzim dan sekuen asam amino dari enzim yang dihasilkan.

Penurunan aktivitas protease dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pH, suhu dan waktu inkubasi (Naiola & Widhyastuti 2007). Menurut Sofro (1990) penurunan aktivitas protease terjadi karena 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. Menurut Agustien (2010) bahwa aktivitas spesifik enzim yang berbeda dari isolat *Bacillus*spp. kemungkinan disebabkan jumlah enzim dan asam amino protein enzim yang dihasilkan masing-masing isolat *Bacillus* spp. berbeda satu sama lainnya. Menurut Lehninger (1998), bahwa aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH, konsentrasi substrat dan enzim, suhu dan adanya aktivator atau inhibitor.

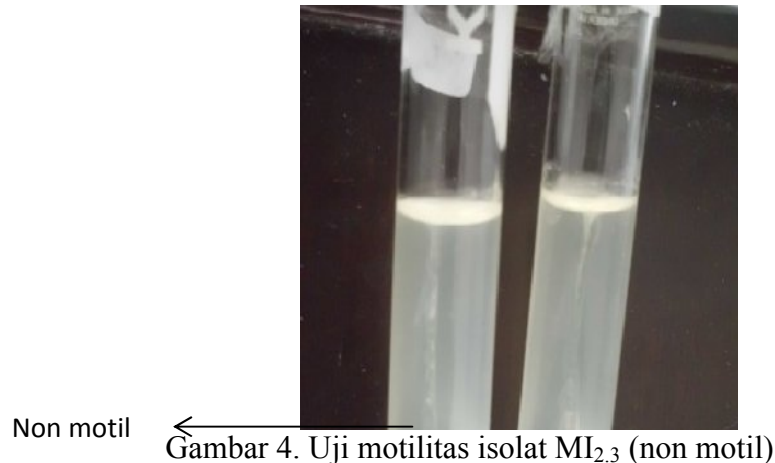
4.3 Karakterisasi Parsial Isolat MI_{2,3}

Karakterisasi parsial dilakukan terhadap isolat yang memiliki aktivitas enzim tertinggi yakni isolat MI_{2,3}. Karakterisasi tersebut mencakup pengamatan bentuk mikroskopis dan makroskopis, pewarnaan Gram, suhu pertumbuhan optimum, pH pertumbuhan optimum dan uji enzimatik.

4.3.1 Bentuk mikroskopis dan makroskopis isolat MI_{2,3}

Pengamatan mikroskopis dan makroskopis isolat bakteri MI_{2,3} pada medium susu skim koloni berbentuk circular, pinggir koloni berbentuk tidak beraturan, berwarna putih, elevasinya datar, permukaan koloni halus mengkilat. Selnya berbentuk batang dan merupakan Gram positif, ukuran koloninya 0,6 mm, bersifat non motil dan katalase positif. Hal ini berbeda dengan isolat TPT 20 dari sumber air

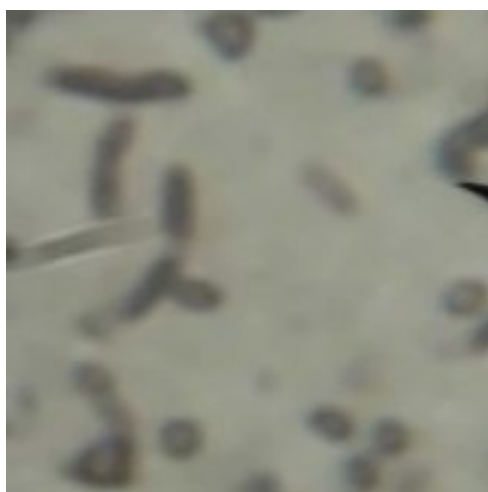
panas Semurup, Jambi yang dilaporkan oleh Fitri (2011) bahwa isolat TPT 20 mempunyai bentuk spora bulat dengan tipe subterminal dan bersifat motil. Isolat MI_{2,3} bersifat non motil dapat dilihat pada gambar 4.



Dari Gambar 4. dapat dilihat bahwa isolat MI_{2,3} tersebut memiliki bakteri yang bersifat non motil, karena pertumbuhannya tidak menyebar. Hal ini berbeda dengan isolat TPT 20 yang berasal dari sumber air panas Semurup, Jambi yang memiliki bakteri bersifat motil (Fitri, 2011). Bakteri ini juga dilakukan pengujian konsentrasi penambahan NaCl yaitu pada penambahan NaCl 3%, 5% dan 7%. Nilai OD tertinggi didapatkan pada konsentrasi penambahan NaCl 7% sebesar 0,006U/ml. Pada konsentrasi 5% didapatkan sebesar 0,005U/ml dan pada konsentrasi 3% didapatkan sebesar 0,003U/ml. Isolat bakteri ini termasuk bakteri halofilik karena mampu hidup pada salinitas yang tinggi. Menurut Black (2005) bahwa bakteri halofilik adalah bakteri yang mampu tumbuh optimum pada kadar sodium klorida 3% - 5% pada media pertumbuhan ataupun substratnya. Optimum atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada kadar garam tertentu disebabkan oleh plasmolisis sel karena perbedaan tekanan osmotik dalam sel. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar and Chan (1988) bahwa tekanan osmotik mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme .

4.3.2 Pewarnaan Gram terhadap isolat bakteri MI_{2,3}

Pewarnaan Gram dilakukan juga terhadap isolat MI_{2,3} yang dapat dilihat pada Gambar 5. Isolat bakteri MI_{2,3} merupakan bakteri yang mempunyai selnya berbentuk batang (bacil) dan bersifat Gram positif. Menurut Fardiaz (1993) bahwa pada bakteri Gram positif dinding sel bakteri terdapat peptidoglikan yang terlarut oleh aseton alkohol sehingga warna biru kompleks zat warna kristal violet tetap dipertahankan pada waktu pewarnaan. Umumnya bakteri Gram negatif memiliki dinding sel dengan kandungan lipida yang tinggi. Lipid larut dalam oleh aseton alkohol sehingga kompleks zat warna kristal violet pada dinding sel tidak dapat dipertahankan dan mengikat zat warna merah safranin pada waktu pewarnaan. Warna merah yang dipertahankan mengindikasikan bakteri Gram negatif (Lay, 1994).



Gambar 5. Bentuk sel bakteri isolat MI_{2,3}

4.3.3 Suhu Optimum Pertumbuhan isolat bakteri MI_{2,3}

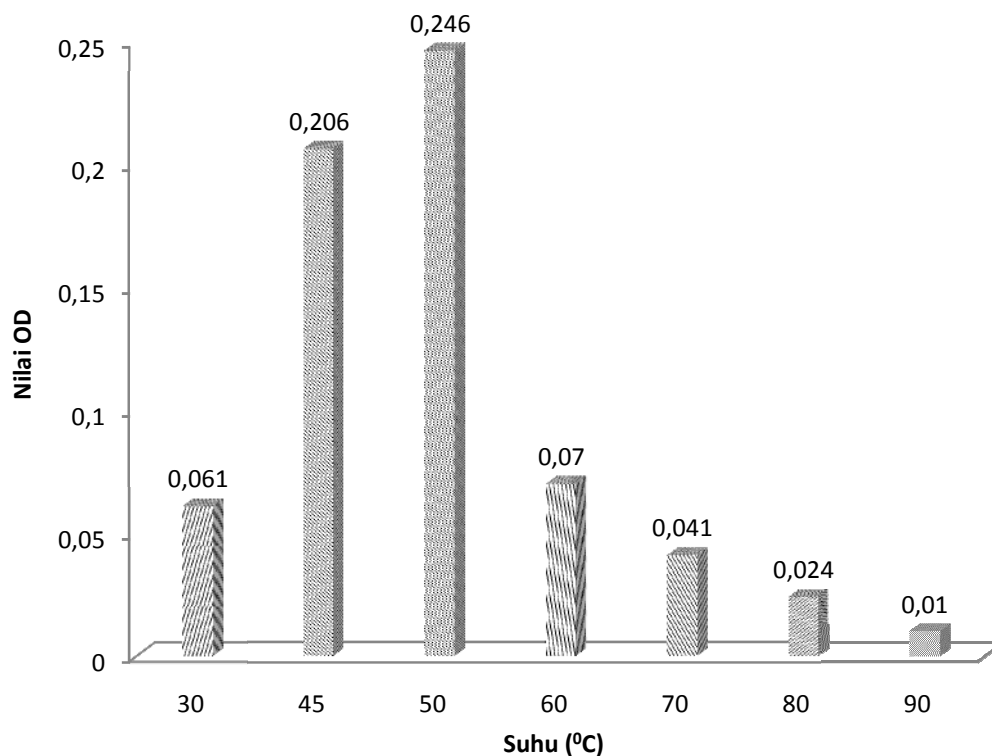
Dari uji penentuan faktor abiotik didapatkan bahwa isolat MI_{2,3} mampu tumbuh optimum pada suhu 50⁰C, ditandai dengan nilai Optical Density absorbansi yang diukur pada panjang gelombang A₆₀₀ di Spektrofotometer. Nilai Optical Density isolat MI_{2,3} terhadap perlakuan suhu dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil rata-rata nilai Optical Density pada perlakuan suhu terhadap isolat MI2.3 pada pH 8

No.	Suhu	OD 600
1.	30 ⁰ C	0,061
2.	45 ⁰ C	0,206
3.	50 ⁰ C	0,246
4.	60 ⁰ C	0,070
5.	70 ⁰ C	0,041
6.	80 ⁰ C	0,024
7.	90 ⁰ C	0,010

Dari Tabel 3 diatas dapat dilihat bahwa isolat MI_{2.3} mampu hidup pada kisaran suhu 30⁰C sampai 90⁰C. Suhu optimum isolat ini dicapai pada suhu 50⁰C dengan aktivitas sebesar 0,246 U/ml sedangkan suhu minimumnya pada suhu 90⁰C. Bakteri termofilik biasanya suhu optimumnya pada suhu 50⁰C. Aktivitas enzim mulai menurun dibawah suhu 50⁰C, mungkin karena sebagian besar protein telah mengalami kerusakan atau denaturasi. Pada suhu 30⁰C memiliki aktivitas sebesar 0,061 U/ml. Pada suhu 90⁰C menunjukkan bahwa enzim masih mempunyai aktivitas sebesar 0,010 U/ml.

Dapat disimpulkan bahwa bakteri ini merupakan bakteri termotoleran karena masih bisa hidup pada suhu rendah dan suhu tinggi, dimana suhu tersebut tidak sama dengan suhu habitatnya. Sesuai dengan pernyataan Johnvesly dan Naik (2001) bahwa *Bacillus sp.* JB99 dapat tumbuh dan menghasilkan protease alkali pada rentang suhu yang sangat luas antara 30 - 60⁰C. Agustien (2010) menyatakan bahwa kelompok mikroorganismenya yang hidup baik pada suhu tinggi maupun suhu rendah dikenal sebagai mikroorganismenya termotoleran. Data pertumbuhan isolat MI2.3 ini dapat dilihat pada grafik yang dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Grafik suhu pertumbuhan isolat MI_{2,3}

Dari Gambar 6. dapat dilihat bahwa pertumbuhan bakteri mengalami penurunan diatas suhu optimum. Terjadi penurunan pertumbuhan bakteri diatas suhu optimum disebabkan fisiologis bakteri berada pada tingkat minimal. Waluyo (2004) menyatakan bahwa suhu maksimum adalah suhu tertinggi yang masih dapat digunakan untuk aktivitas mikroba, tetapi pada tingkatan fisiologis yang paling minimal. Fitri (2011) melaporkan bahwa isolat TPT 20 dari sumber air panas Semurup, Jambi mampu hidup pada rentang suhu antara 45⁰C sampai 90⁰C dengan pertumbuhan optimumnya pada suhu 60⁰C.

4.3.4 pH pertumbuhan optimum isolat bakteri MI_{2,3}

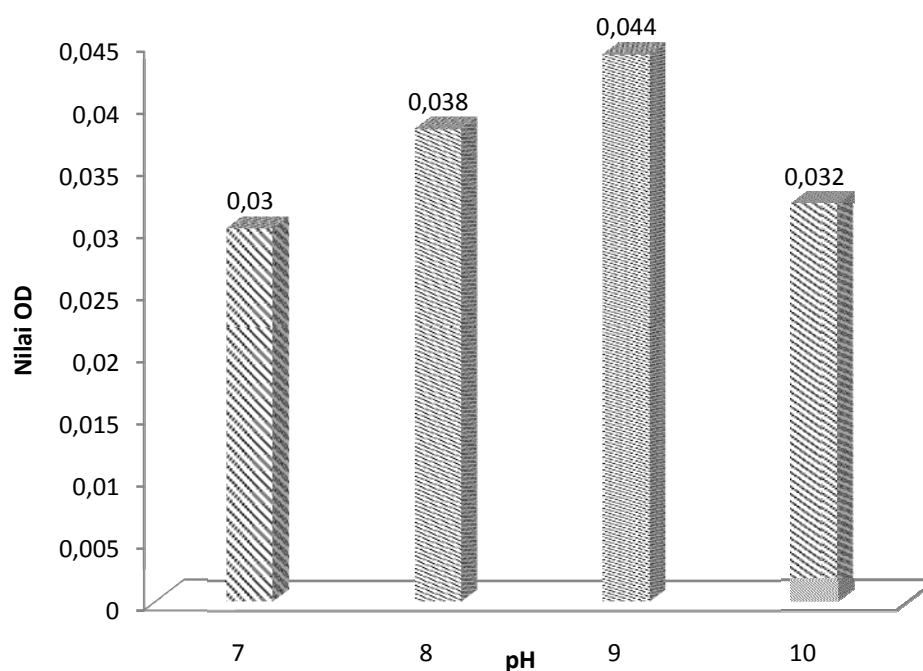
Isolat MI_{2,3} dilakukan juga terhadap beberapa nilai pH yaitu 7,8,9,10. Isolat MI_{2,3} ini mampu tumbuh optimum pada pH 9 dengan perlakuan pada suhu 50⁰C. Hal ini

ditandai dengan adanya nilai Optical Density yang dapat dilihat di Spektrofotometer dengan menggunakan panjang gelombang A_{600} . Hal ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil rata – rata pH pertumbuhan optimum pada isolat MI_{2,3} pada suhu 50⁰C

No.	pH	OD 600
1.	7	0,030
2.	8	0,038
3.	9	0,044
4.	10	0,032

Dari Tabel 4. dapat dilihat bahwa isolat MI_{2,3} mampu hidup pada pH 7 sampai 10 dengan pertumbuhan optimum isolat MI_{2,3} ini pada pH 9 dengan OD sebesar 0,044 dan nilai OD terendah sebesar 0,030 pada pH 7. Hal ini sesuai dengan pertumbuhannya pada habitat aslinya yang memiliki pH tinggi. pH pertumbuhan isolat ini dapat dilihat pada Gambar 7 dalam bentuk grafik.



Gambar 7. Grafik pH pertumbuhan isolat MI_{2,3}

Dari Gambar 7. dapat dilihat bahwa bakteri dapat hidup pada rentang pH 7 sampai pH 10. Pada pH tersebut bakteri ini masih mampu hidup. Dari gambar dapat

dilihat bahwa pertumbuhan optimum terdapat pada pH 9 dan masih mampu hidup diatas pH 9 sehingga bakteri ini bisa dikelompokkan ke dalam bakteri alkaiifik, bakteri alkalifilik merupakan bakteri yang optimum pertumbuhannya pada pH alkali. Walaupun nilai pH optimum enzim tersebut lebih tinggi daripada pH lingkungan tempat pengambilan sampel, tetapi enzim tersebut menunjukkan aktivitas yang relatif tinggi. Sesuai dengan pernyataan Legninger, (1982) bahwa aktivitas katalitik enzim di dalam sel mungkin diatur sebagian oleh perubahan pada pH medium lingkungan. pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan. Protease alkali merupakan protease yang aktif pada interval pH netral sampai alkali, mempunyai sisi aktif serin dan mempunyai nilai komersial yang sangat penting (Gupta, Beg. &Lorenz. 2002). Menurut Agustien(2010) menyatakan bahwa isolat A-03 dapat ditumbuhkan pada rentang pH yang luas, antara pH 5 – 11, dan sangat baik pertumbuhannya pada pH 8 – 9. Protease alkali bermanfaat untuk aplikasi detergen yang kebanyakan aktif pada rentang pH alkali antara pH 8 – 12 (Peres *et al.*, 1999).

Pada pH diatas pH optimum memperlihatkan isolat MI_{2,3} mengalami penurunan pertumbuhan hal ini disebabkan perubahan pH dari pH optimumnya yang menyebabkan terjadinya denaturasi enzim. Lechninger (1988) menyatakan bahwa pH sangat mempengaruhi reaksi enzimatik dimana perubahan pH berakibat langsung terhadap gugus – gugus ionik enzim. Pada pH tinggi enzim akan terionisasi dengan kehilangan muatan positifnya. Selain itu perubahan pH terlalu besar diatas pH optimum menyebabkan denaturasi enzim. Kumar dan Takagi (1999) mengatakan bahwa protease alkali dari genus *Bacillus* dapat digunakan sebagai bahan aditif detergen.

4.3.5 Uji Enzimatik terhadap Isolat MI_{2,3}

Pengujian enzimatik dilakukan terhadap isolat bakteri MI_{2,3} dalam kemampuan penghasilan enzim amilase, selulase, dan lipase. Isolat bakteri MI_{2,3} selain

mempunyai kemampuan menghasilkan enzim protease juga mempunyai kemampuan menghasilkan amilase. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji enzimatik pada isolat MI_{2,3}

No.	Uji Enzimatik	Hasil
1.	Amilase	+
2.	Lipase	-
3.	Selulase	-
4.	Katalase	+

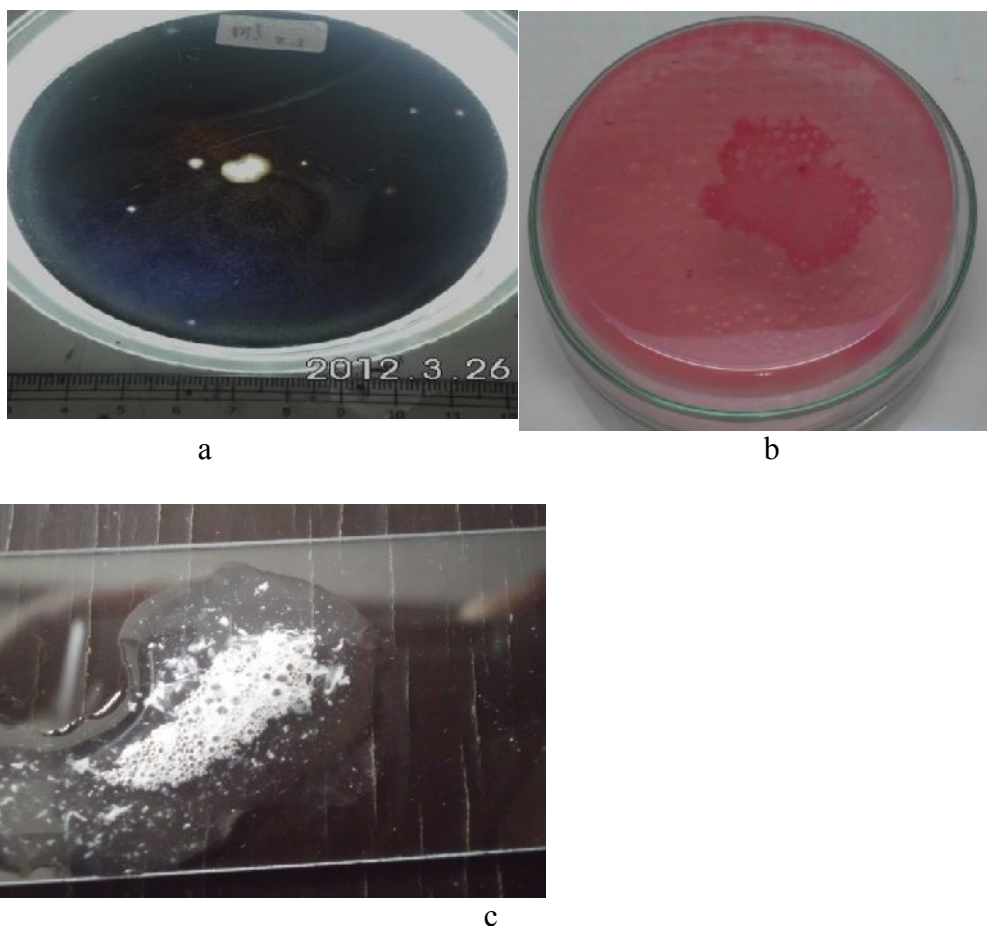
Ket : + Uji positif (menghasilkan enzim)

- Uji negatif (tidak menghasilkan enzim)

Isolat MI_{2,3} pada uji enzimatik menghasilkan uji positif pada amilase dan katalase kemudian uji negatif pada lipase dan selulase. Hasil uji amilase terhadap isolat MI_{2,3} membuktikan adanya enzim amilase dengan terbentuknya zona bening pada medium amilum setelah dilakukan penambahan lugol. Isolat ini negatif menghasilkan selulase dan lipase sehingga dapat kita lihat bahwa isolat ini tidak dapat menghidrolisis selulosa dan lipid. Isolat ini positif pada uji katalase, hal ini berarti isolat MI_{2,3} bersifat aerob. Hasil uji katalase dengan penambahan peroksida mengindikasikan isolat bersifat aerob ditandai dengan terbentuknya gelembung udara disekitar koloni uji katalase membuktikan adanya enzim katalase pada isolat MI_{2,3} yang berfungsi menghidrolisis H₂O₂ menjadi O₂.

Isolat MI_{2,3} tidak mampu menghidrolisis lipid, dimana isolat ini tidak membentuk pendaran warna orange ketika diletakkan pada sinar UV ketika isolat ini ditumbuhkan pada medium olive oil dan Rhodamin b. Akan tetapi isolat ini mampu hidup dengan memanfaatkan sumber nutrisi yang ada pada medium. Menurut Tika, Redhana, dan Ristiati (2007) menyatakan bahwa lipase merupakan enzim yang menghidrolisis rantai panjang trigliserida, dimana enzim ini digunakan dalam memproduksi asam lemak dan dijadikan prekursor berbagai industri. Hal yang berbeda ditemukan pada isolat TPT 20 yang bersifat proteolitik yang mampu

menghasilkan lipase (Fitri, 2011). Hasil uji enzimatik yang telah dilakukan terhadap isolat MI_{2,3} dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 8. a. uji amilase positif pada Isolat MI_{2,3} ditandai adanya zona bening pada medium setelah ditetesi lugol b. Uji lipase negatif pada isolat bakteri MI_{2,3} c. Uji katalase positif pada isolat MI_{2,3} yang ditandai dengan terbentuknya gelembung udara pada isolat bakteri MI_{2,3}

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Diperoleh bakteri termofilik yang menghasilkan protease sebanyak 39 isolat yang ditemukan pada sumber air panas Sungai Medang. Isolat bakteri yang memiliki indeks proteolitik tertinggi adalah MII_{2.1} yaitu 7,89 mm. Dan nilai uji aktivitas enzim protease tertinggi terdapat pada isolat MI_{2.3} yaitu sebesar 13,592 U/ml.
2. Karakter dari isolat bakteri MI_{2.3} bersifat Gram positif, sel berbentuk batang, bersifat non motil. Suhu pertumbuhan optimum 50⁰C dan pH optimum 9,0. Isolat MI_{2.3} ini positif pada uji amilase dan katalase namun negatif pada uji selulase dan lipase.

5.2 Saran

Disarankan untuk melakukan optimasi untuk meningkatkan produksi protease dari isolat MI_{2.3}

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, MWW. 1999. The biochemical diversity of life near & above 100 degrees C in marin environments. *Appl. Microbiol.* 85, 108S – 117S.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil enzim Protease Alkalin Termostabil. *Balai Penelitian Bioteknologi & Sumberdaya Genetik Pertanian*. Bogor.
- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung
- Agustien, A. 2010. *Isolasi, Optimasi & Amobilisasi Brevibacillus agri A-03 dari Sumber Air Panas Sumatera Barat Penghasil Protease Alkali & Keratinase Termostabil Serta Aplikasinya*. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung.
- Atlas, R.M & Ronald, 1997. *Principles of Microbiology*, 2nd Ed., WBC Mc Grow-Hill Book, New York.
- Aunstrup, K.O, O. Andressen, E.A. Falch, & T.K. Nielsen. 1979. Production of microbial enzymes. In. Pepples, H.J & D. Perlman (Eds.). *Microbial Technology*. 1. Academic Press Inc., New York.
- Black, J.G. 2005. *Microbiology: Principles and Eksplorasion 6th ed*. Jhon Wiley & Sons, Inc. United States of America
- Bonang, G dan E. S. Koeswardono. 1979. *Mikrobiologi Kedokteran*. Gramedia. Jakarta.
- Bonang, G dan E. S. Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Gramedia. Jakarta.
- 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.
- Desriningsih. 2011. *Efek Suhu Inkubasi & pH Medium dalam Produksi Amilase dari Isolat Bakteri TPT 30 Thermo-Alkalifilik*. Skripsi Sarjana Biologi, Universitas Andalas, Padang
- Dewi, I.M. 2008. *Isolasi Bakteri & Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun Sumatera Utara*. Tesis Pasca Sarjana Biologi, Universitas Sumatera Utara, Medan.
- 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.

- Eichler, J. 2001. *Biotechnological uses of archacal extremozymes. Research Review Paper*. Departement Of Life Sciences, Ben Gurion University, Beersheva 84105, Israel
- Famelia, R. 2004. *Pengaruh Beberapa Logam Terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh Bacillus bbrevis MB6 pada Medium Fermentasi Limbah Cair Tahu*. Skripsi Sarjana Biologi, Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas. Padang
- Fardiaz, S. 1987. *Fisiologi Fermentasi*. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Fitri, K. 2011. *Isolasi & Karakterisasi Parsial Bacillus sp Termo-Alkalifik Proteolitik Asal Sumber Air Panas Semurup, Jambi*. Skripsi Sarjana Biologi. Universitas & alas. Padang
- Gupta, R., Q. K. Beg & P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59 : 13 -32.
- Johnvesly, B & G.R. Naik. 2001. Studiy on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp*. JB99 in a chemically defined medium. *Journal Process Biochemistry*, 37: 139 – 144.
- Kamelia, R., M. Sidumarta & Natalia, D. 2005, *Isolasi & Karakterisasi Protease Intraselular Termostabil & Bakteri Bacillus stearotherophilus RPI*, Makalah Seminar Nasional MIPA, FMIPA Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kumar, C. G. & Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advance*, 17 : 561 – 594.
- Kumar, S. & R. Nussinov. 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? A review. *Cell Molecular Life Science*, 58 : 1216- 1233.
- Kurniawan.H.M. 2011.*Isolasi & Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-Proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup, Kab. Kerinci, Jambi*. Tesis Pasca Sarjana, Universitas Andalas, Padang
- Lay, BW.1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT. Grafindo Persada. Jakarta
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar – Dasar Biokimia Jilid 1*. Terjemahan Maggy Thenawidjaja. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Lehninger,A.L. 1998. *Biochemistry*. Academic Press. New York.
- Lestari, P. 2000. Ulasan: Eksplorasi enzim termostabil dari mikroba termofil. *Hayati*. 7 : 0854 – 8587.
- Madigan, MT & Marrs BL. 1997. *Extremophiles*. Sci Am : 276

- Madigan, M. T. J. M. Martinko & J. Parker. 2000. *Biology of Microorganisms*. 9th Ed. Prentice Hall International, Inc., New Jersey.
- Martins, MLL., Delatorre ABS & Camila R. 2007. Effect of Culture Conditions On The Production of Extracellular Protease by Thermophilic *Bacillus* sp, & some Properties of The Enzymatic Activity. Brazilia. *Microbiol.* 38 : 253 - 258
- Moon, S.H. & S.J. Parulekar. 1993. Some observation on protease producing in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. *Biotech. Bioeng.* 41:43-54.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W., 2003. *Biokimia*. Jakarta. EGC. 70 – 102
- Naiola, E & Widhyastuti, N. 2007. Semi purifikasi dan karakterisasi enzim protease *Bacillus* Sp. Berk Penel. *Hayati*. 13 : 51 - 56
- Pakhpahan, R. 2009. *Isolasi Bakteri & Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara, Sumatera Utara*. Tesis Pasca Sarjana Biologi, Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Perez, M., R. Bocourt, J. Galindo, G. Milian, R. Paid, R. Alonso & G. Alonso. 1999. Isolation and selection of *Bacillus* sp. strains producing proteolytic enzymes. *Cuban Journal Agriculture Science*, 33 : 401 - 408
- Purwadaria, T., A. Suwanto., H. Dirnawan. 2000. *Eksplorasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler dari Sumber Air Panas Gunung Pancar, Hayati*, 7, 2 : 52-55
- Rajasa, H. 2003. Pidato pembukaan 3rd conference on industrial enzyme & biotechnology. *Technology & Business Opportunity for Industrial Enzyme in Harmony with Environment*. BPPT. Jakarta, 6-7 Oktober 2003.
- Rao, MB. Tanksale AM, Ghatge MS & Deshpande VV. 1998. Molecular & Biotechnological aspects Of Microbial Proteases. *Microbiology & molecular Biology review*. 62 : 597 – 635.
- Reka, N. 2002. *Aktivitas & Karakterisasi Enzim Protease dari Bacillus sp 1 & sp 2 Isolat dari Sumber Air Panas Rimbo Panti*. Skripsi Sarjana Biologi. Universitas Andalas. Padang
- Sofro, ASM. 1990. *Biokimia*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. UGM. Yogyakarta
- Setiani, Y. 2008. *Penggunaan Beberapa Sumber Karbon Untuk Produksi Enzim Protease Alkali oleh Bacillus sp Termofilik*. Skripsi Sarjana Biologi. Universitas Andalas. Padang

- Sugiyono, Lintang R A.J & Sabe RA. 2008. Karakterisasi Protease Bakteri Termofil Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. *Penelitian Perikanan*, 11: 2
- Suhartono, M.T., 2000, *Exploration Of Indonesian Thermophiles Producing Thermostable Chitinolytic Enzymes*, Report, Research Center For Biotechnology, Bogor Agric. University. Bogor.
- Sumantha, A., C. Larriche, & A. P&ey. 2006. Microbiology & industrial of food-grade protease : A perspective. *Food. Technology, Biotechnology*, 44, 2 : 211-220.
- Susanti, E. 2002. Isolasi dan karakterisasi Protease dari Bacillus subtilis 1012M15. *Biodiversitas*, 4 : 12 – 17.
- Tika, N., Redhana I W & Ristiati P. 2007. *Isolasi Enzim Lipase Termostabil Dari Bakteri Termofilik Isolat Air Panas Banyuw&g Kecamatan Gerogak, Buleleng Bali. Akta Kimindo*, 2 : 109 – 112
- Trivedi, S., H. S. Gehlor and S.R. Rao. 2006. Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genetics and Molecular Research*. 5, 4: 816-827.
- Ward, O.P. 1985. Proteolytic enzymes. In Young, M.M. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology: The principles, Applications, & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture & Medicine*. 3. Pergamon Press. Oxford.
- Winarno, F. G. 1986. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta

Lampiran 1. Komposisi medium yang digunakan dalam penelitian

A. Medium Nutrien Agar (NA)

1. NA : 20 g
2. Air Suling : 1000 ml
3. pH : 7,4

B. Medium Skim Milk Agar (SMA)

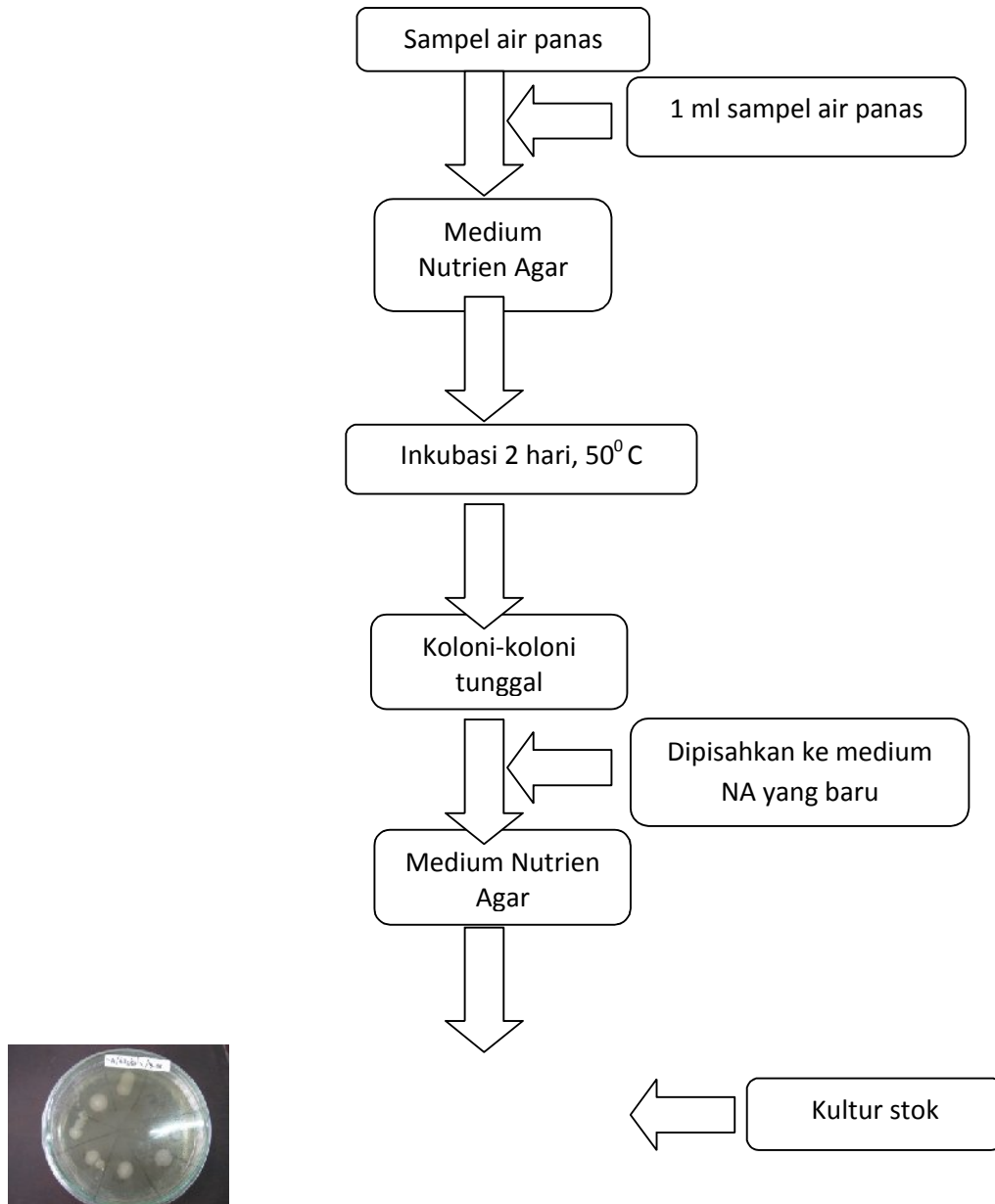
1. Susu Skim : 20 g
2. Bacto Agar : 15 g
3. Air Suling : 1000 ml
4. pH : 8

C. Medium Basal

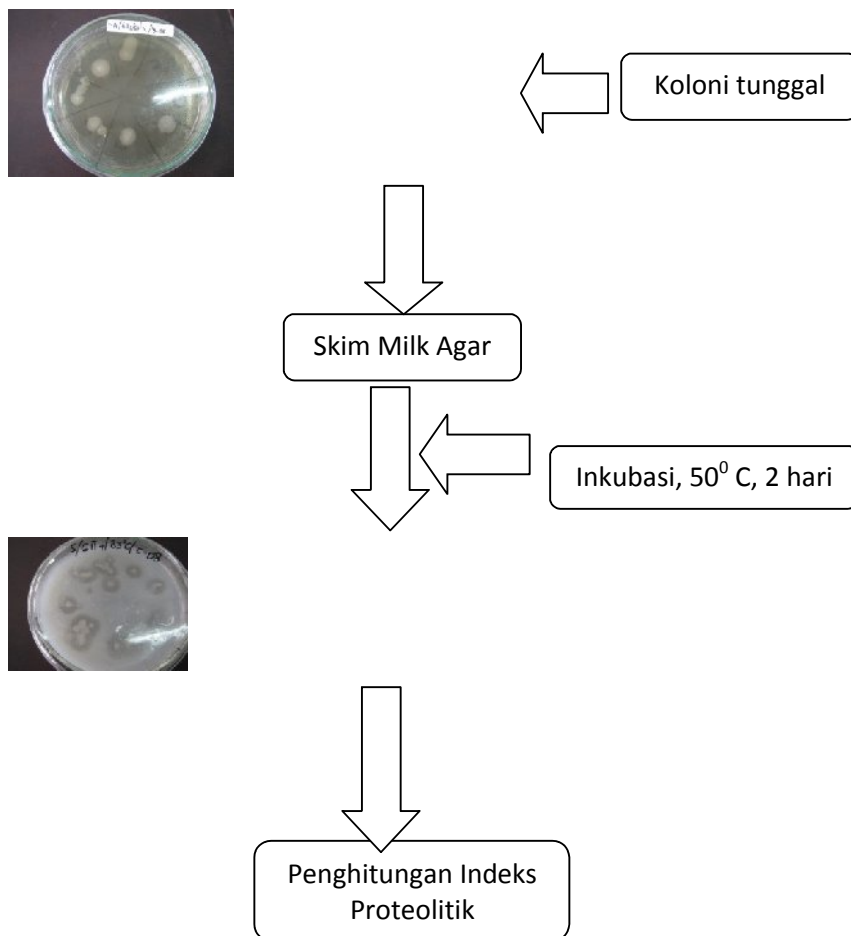
1. K_2HPO_4 : 5 g
2. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,3 g
3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0,2 g
4. NaCl : 5,0 g
5. Kasein : 10 g
6. Air Suling : 1000 ml
7. pH : 8

Lampiran 2. Alur kerja isolasi dan penapisan bakteri termofilik

1. Isolasi Bakteri Termofilik



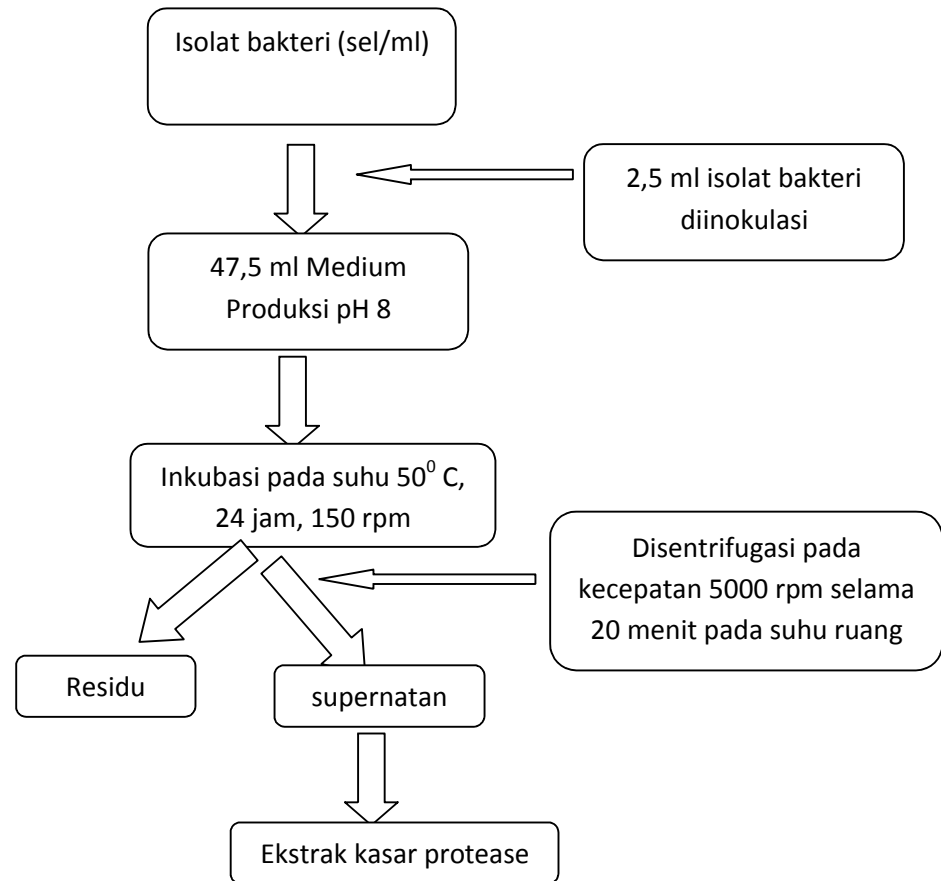
2. Penapisan bakteri termo-proteolitik



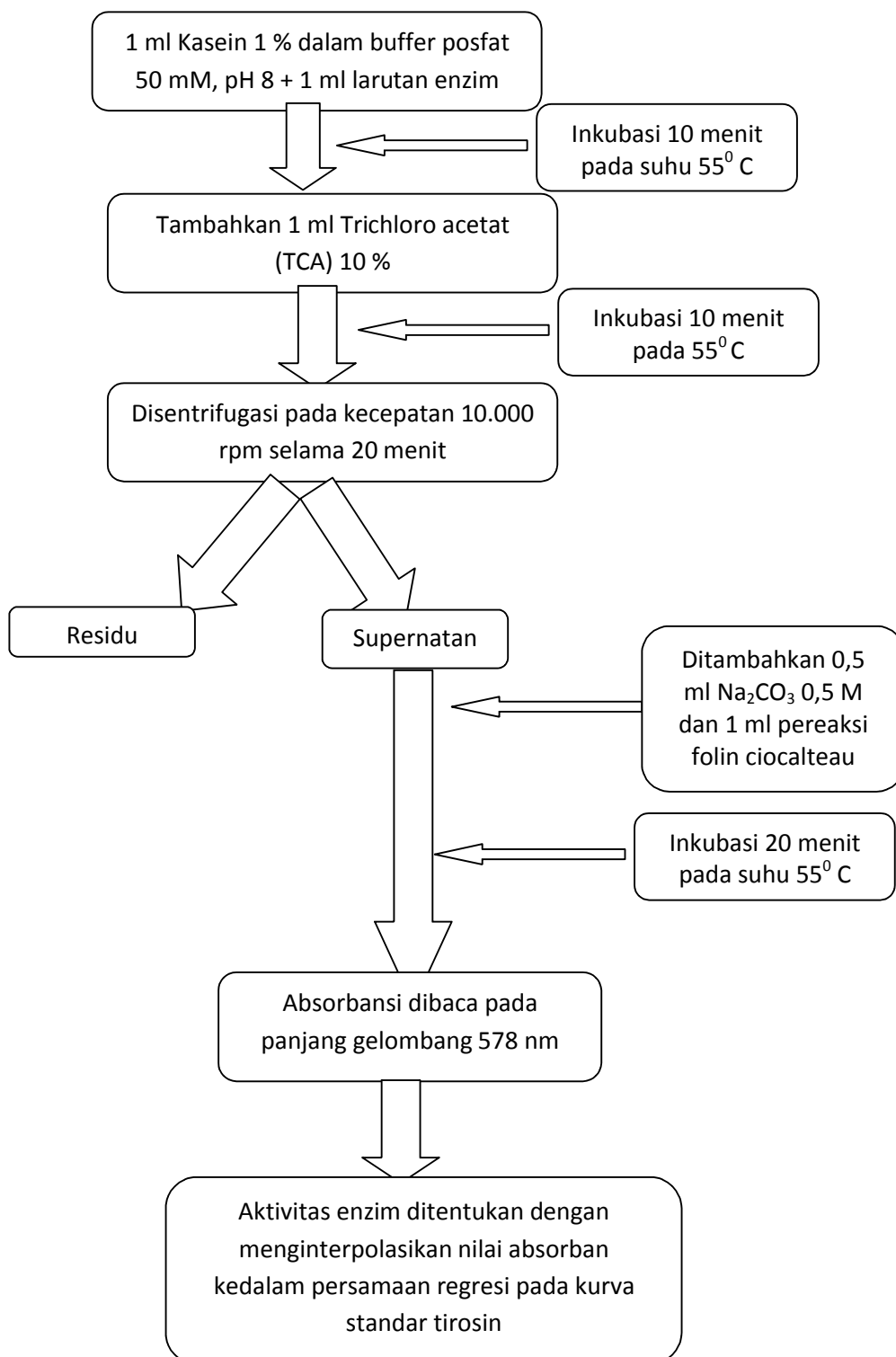
Lampiran 3. Gambar isolat bakteri termofilik asal sumber air panas Sungai Medang penghasil protease



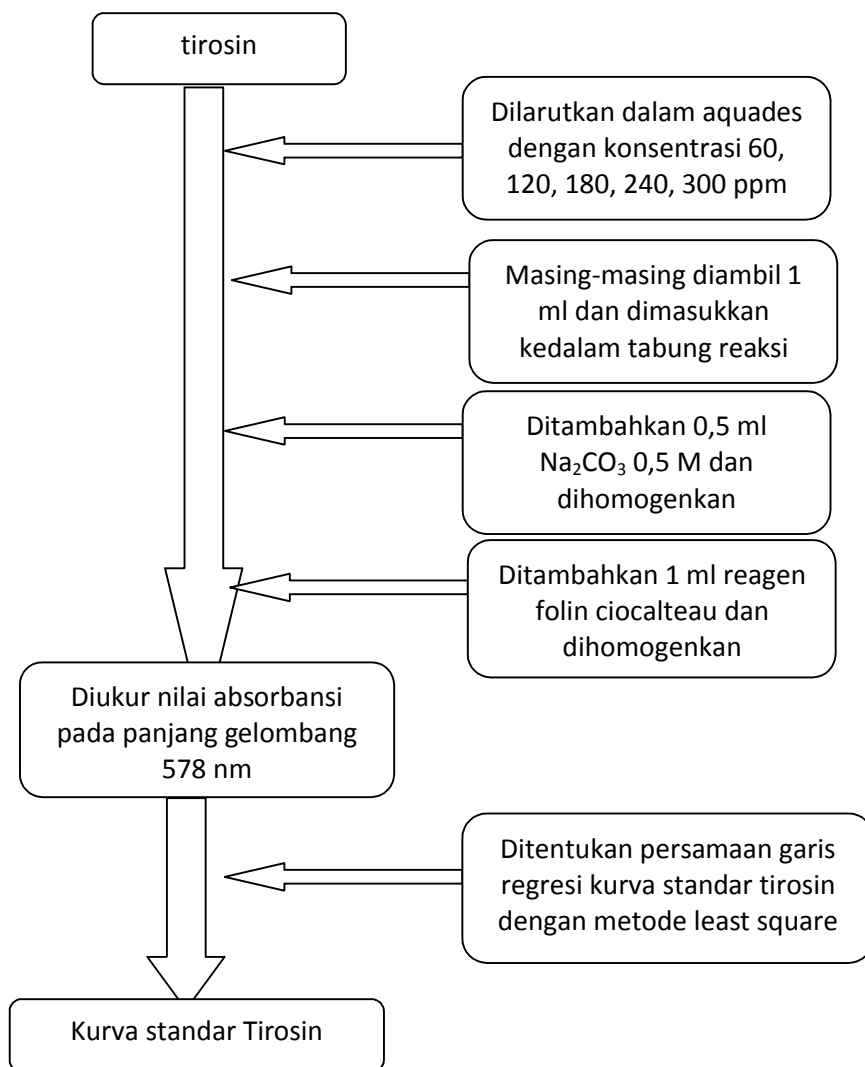
Lampiran 4. Alur kerja isolasi enzim protease



Lampiran 5. Alur Kerja Uji aktivitas protease dengan metode Ward (1984)



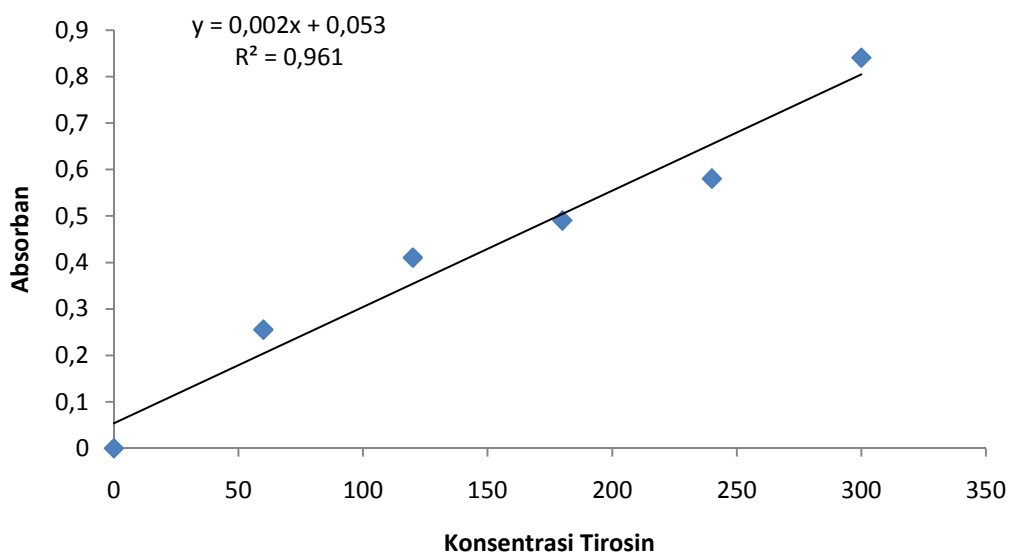
Lampiran 6. Alur kerja pembuatan kurva standar Tirosin



Lampiran 7. Tabel Nilai absorbansi standar tirosin dengan menggunakan spektrofotometer $\lambda = 578 \text{ nm}$

No.	Konsentrasi Tirosin	Absorban
1.	0	0
2.	60	0,255
3.	120	0,410
4.	180	0,490
5.	240	0,580
6.	300	0,840

Lampiran 8. Grafik kurva standar tirosin yang diperoleh



Gambar. Kurva standar tirosin

Tabel Penentuan Persamaan Garis Regresi Larutan Standar Tirosin untuk berbagai konsentrasi dengan menggunakan Spektrofotometer

No.	X	Y	XY	X ²
1.	0	0	0	0
2.	60	0,255	15,3	3600
3.	120	0,410	49,2	14400
4.	180	0,490	88,2	32400
5.	240	0,580	139,2	57600
6.	300	0,840	252	90000
Σ	900	2,575	543,9	198000

Persamaan garis regresi :

Dimana :

X = Konsentrasi tirosin

Y = Absorbansi

Persamaan garis regresi : $y = a + bx$

$$b = \frac{\sum XY - (\sum y)(\sum X) / n}{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n}$$

$$= \frac{543,9 - (2,575)(900) / 6}{198000 - (900)^2 / 6}$$

$$b = \frac{157,65}{63000} = 0,0025$$

$$a = Y_{\text{rata-rata}} - b X_{\text{rata-rata}}$$

$$a = Y_{\text{rata-rata}} - b X_{\text{rata-rata}}$$

$$= 2,575/6 - 0,0025 (900/6)$$

$$= 0,4292 - 0,375$$

$$a = 0,0542$$

$$Y = a + bX \text{ maka : } Y = 0,0542 + 0,0025x$$

Tabel Penentuan koefisien korelasi (R^2)

X_i	Y_i	$Y_i - Y_{\text{rata}}$	$(Y_i - Y_{\text{rata}})^2$	$Y_r = a + bX_i$	$Y_r - Y_{\text{rata}}$	$(Y_r - Y_{\text{rata}})^2$
0	0	-0,4292	0,1842	0,0542	-0,375	0,1406
60	0,255	-0,1742	0,0304	0,2042	-0,225	0,0506
120	0,410	-0,0192	0,0004	0,3542	-0,075	0,0056
180	0,490	0,0608	0,0037	0,5042	0,075	0,0056
240	0,580	0,1508	0,0227	0,6542	0,225	0,0506
300	0,840	0,4108	0,1686	0,8042	0,375	0,1406
X_{rata} = 150	Y_{rata} = 0,4292	0	0,41	2,5752	0	0,3936

Dari tabel diatas terlihat bahwa $R^2 = JKR/JKT = 0,3936/0,41 = 0,96$

Lampiran 8. Lokasi pengambilan sampel di Sumber Air Panas Sungai Medang



Kolam 1



Kolam 2



Kolam 3



Kolam 4



Kolam 5

Lampiran 9. Peta lokasi penelitian

