



TUGAS AKHIR SB-141510

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI *Candida G3.2*

**NIKITA DANNISWARA PRASETYO
1512 100 075**

**Dosen Pembimbing
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si**

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2016**



FINAL PROJECT SB-141510

OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION FROM *Candida* G3.2

NIKITA DANNISWARA PRASETYO
1512 100 075

Advisor Lecturer
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si

Department of Biology
Faculty of Mathematic and Sciences
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya 2016

LEMBAR PENGESAHAN

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI *Candida*
G3.2**

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

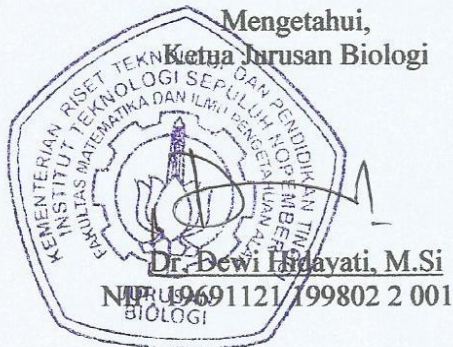
NIKITA DANNISWARA PRASETYO
NRP. 1512 100 075

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si (Pembimbing 1)

Surabaya, 28 Juni 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



OPTIMASI PRODUKSI ENZIM PROTEASE DARI *Candida* G3.2

Nama : Nikita Danniswara Prasetyo
NRP : 1512 100 075
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

Abstrak

Protease (EC 3.4) merupakan salah satu kelas enzim yang penting dalam aplikasi bioteknologi dan industri dan menempati sekitar 60% dari total penjualan enzim. Enzim protease banyak dihasilkan dari mikroorganisme, salah satunya adalah marine yeast. Produksi enzim protease dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti masa inkubasi, suhu dan pH. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui masa inkubasi serta suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease dari Candida G3.2.

Optimasi produksi protease diawali dengan optimasi masa inkubasi dilanjutkan dengan optimasi suhu dan pH. Variasi masa inkubasi yang digunakan adalah 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 dan 168 jam. Variasi suhu yang digunakan adalah suhu ruang, 45°C dan 55°C. Sedangkan variasi pH yang digunakan adalah 4,5, 7 dan 9. Pengujian optimasi produksi protease didasarkan pada aktivitas enzim yang dihasilkan dengan tirosin sebagai produk yang diukur. Desain penelitian untuk perlakuan suhu dan pH menggunakan rancangan faktorial. Data aktivitas enzim untuk masa inkubasi dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Sedangkan data aktivitas enzim untuk suhu dan pH dianalisis secara statistik menggunakan Anova Two-Way. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Candida G3.2 mampu memproduksi enzim protease secara optimal pada masa inkubasi 72 jam dengan nilai aktivitas enzim sebesar 321,5 U/mL serta pada suhu 55°C dan pH 9 dengan nilai aktivitas enzim 135,25 U/mL.

Kata kunci: aktivitas enzim, Candida G3.2, protease, tirosin

OPTIMIZATION OF PROTEASE PRODUCTION FROM
Candida G3.2

Student Name : Nikita Danniswara Prasetyo
NRP : 1512 100 075
Department : Biology
Advisor Lecturer : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

Abstract

Protease (EC 3.4) is one of an enzyme classes which important in biotechnology and industrial applications and occupying about 60% of the total sales of enzyme. Protease could be produced by microorganism, one of those is marine yeast. Protease production is highly influenced by several factors, such as incubation time, temperature and pH. The aim of this study is to determine the incubation time and temperature and pH which is optimal for the production of protease from *Candida* G3.2.

Optimization of protease enzyme production started with optimization of incubation period and followed by optimization of temperature and pH. Variations of the incubation period used are 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 dan 168 hours. Variations of temperature used are room temperature, 45°C and 55°C. While the pH variations used are 4.5, 7 and 9. The optimization protease production assay is based on the enzyme activity with tyrosine as measured product. The research design for temperature and pH used is factorial design. The enzyme activity data for incubation time were analyzed descriptively quantitative. Meanwhile, the enzyme activity data for temperature and pH were analyzed statistically using ANOVA Two-Way. The results showed that *Candida* G3.2 is capable of producing protease optimally on 72 hour of incubation period with the value of enzyme activity is 321.5 U/mL and at 55°C and pH 9 with the value of enzyme activity is 135,25 U/mL.

Keywords: enzyme activity, *Candida* G3.2 , protease, tyrosine

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	ix
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Marine Yeast</i>	5
2.2 <i>Candida G3.2</i>	6
2.3 <i>Marine Yeast</i> Penghasil Protease.....	7
2.4 Protease.....	8
2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Protease...	12
2.6 Aktivitas Enzim Protease.....	13
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Metode yang Digunakan	15
3.2.1 Subkultur isolat <i>marine yeast</i>	15
3.2.2 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat <i>marine yeast</i>	15
3.2.3 Pembuatan medium produksi enzim protease.....	16
3.2.4 Optimasi produksi enzim protease	16
3.2.5 Pembuatan kurva standar tirosin	17
3.2.6 Produksi enzim protease.....	18
3.2.7 Uji aktivitas enzim protease.....	18

3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data	19
BAB IV HASIL dan PEMBAHASAN	
4.1 Kurva Pertumbuhan <i>Candida</i> G3.2.....	21
4.2 Optimasi Produksi Enzim Protease.....	22
4.2.1 Optimasi masa inkubasi.....	23
4.2.2 Optimasi suhu dan pH.....	25
BAB V KESIMPULAN dan SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi Umum Protease dengan Kode E.C dan Mekanisme Spesifik Tiap Subgrup.....	11

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Karakteristik Makroskopik <i>Candida</i> G3.2.....	7
Gambar 2.2 Mekanisme Umum Hidrolisis Enzimatik Substrat Peptida.....	10
Gambar 2.3 Struktur Kimia Tirosin.....	13
Gambar 4.1 Profil Kurva Pertumbuhan <i>Candida</i> G3.2....	22
Gambar 4.2 Grafik Pengaruh Masa Inkubasi terhadap Produksi Enzim Protease dari <i>Candida</i> G3.2.....	24
Gambar 4.3 Grafik Pengaruh Suhu dan pH terhadap Produksi Enzim Protease dari <i>Candida</i> G3.2.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Skema Penelitian.....	43
Lampiran 2	Pembuatan Medium YMEA (<i>Yeast Malt Extract Agar</i>).....	44
Lampiran 3	Pembuatan Medium YMB (<i>Yeast Malt Broth</i>).....	45
Lampiran 4	Kurva Standar Tirosin.....	46
Lampiran 5	<i>Optical Density</i> Kurva Pertumbuhan <i>Candida G3.2</i>	47
Lampiran 6	Hasil Uji Aktivitas Optimasi Masa Inkubasi	48
Lampiran 7	Hasil Uji Aktivitas Optimasi Suhu dan pH...	50
Lampiran 8	Hasil Analisis Data Anova.....	51

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri komersial. Lebih dari 500 produk industri dibuat menggunakan enzim. Permintaan dalam bidang industri enzim mengalami kenaikan secara terus menerus didorong oleh kebutuhan pasar yang terus berkembang. Total penjualan pada industri enzim mencapai \$3,3 milyar di tahun 2010 (Adrio dan Demain, 2014) dan diperkirakan akan mencapai angka \$6 milyar di tahun 2016 (Gupta *et al.*, 2015).

Enzim protease merupakan salah satu kelas enzim yang penting dalam aplikasi bioteknologi dan industri. Enzim ini menempati sekitar 60% dari total penjualan enzim (Oyeleke *et al.*, 2010). Enzim protease banyak digunakan dalam bidang industri deterjen, pangan, kulit, farmasi dan industri kimia lainnya (Li *et al.*, 2013). Penggunaan enzim protease yang paling besar adalah pada bidang industri deterjen dimana protease mengkatalisis penghilangan noda yang mengandung protein pada pakaian (Najafi *et al.*, 2005).

Protease (EC 3.4) merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida pada protein (Ayaz, 2012). Produksi enzim protease paling banyak dihasilkan oleh mikroorganisme (Jisha *et al.*, 2013). Mikroorganisme sebagai sumber enzim lebih menguntungkan karena mudah dikultivasi dalam skala besar dan waktu yang relatif singkat, kecepatan pertumbuhan relatif lebih cepat dan enzim yang dihasilkan lebih stabil. Selain itu mikroorganisme mudah direkayasa secara genetika untuk mendapatkan produksi enzim yang optimum (Chi *et al.*, 2007). Salah satu mikroorganisme yang mampu memproduksi enzim protease adalah *marine yeast*.

Banyak spesies *yeast terrestrial* dilaporkan mampu memproduksi enzim protease di antaranya adalah *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica* dan *Cryptococcus dimennae*

(Ogrydziak, 1993), *Candida humicola* (Ray et al., 1992) dan *Rhodotorula glutinis* K-24 (Kamada et al., 1972). Namun hanya sedikit publikasi mengenai produksi enzim protease oleh *marine yeast* antara lain *Aureobasidium pullulans* strain 10 (Chi et al., 2007; Ma et al., 2007), *Metschnikowia reukaufii* W6b (Li et al., 2010) dan *Rhodotorula mucilaginosa* L7 (Lario et al., 2015).

Produksi protease banyak dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pH, suhu dan masa inkubasi (Beg et al., 2003). Mayoritas proses industri membutuhkan enzim yang mampu bertahan pada kondisi yang ekstrem. Sehingga sangat penting untuk enzim yang digunakan memiliki kondisi yang optimal pada rentang suhu dan pH yang luas (Bizuye et al., 2014). Masa inkubasi yang sesuai akan menghasilkan produksi protease yang maksimum ditandai dengan tingginya aktivitas enzim yang dihasilkan (Yuniati et al., 2015). Secara umum, tiap strain *yeast* memiliki kondisi yang berbeda untuk dapat memproduksi protease secara optimal (Choudhary dan Jain, 2012). *Aureobasidium pullulans* strain 10 yang diisolasi dari sedimen air laut di Qingdao, China mampu menghasilkan protease yang optimal pada medium dengan pH 9, suhu 24,5°C dan masa inkubasi 30 jam (Chi et al., 2007). *Marine yeast Metschnikowia reukaufii* W6b diisolasi dari sedimen Laut Cina Selatan mampu memproduksi protease yang menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu 40°C and pH 3,5 dengan masa inkubasi 48 jam. Pada kondisi optimal, ekstrak enzim menunjukkan aktivitas protease sebesar 72,5 U/ml (Li et al., 2010).

Pada penelitian sebelumnya (Alami dan Shovitri, 2015) ditemukan bahwa isolat *Candida* G3.2 yang diisolasi dari Kawasan Rhizosfer Mangrove Gunung Anyar, Surabaya mampu mendegradasi protein. Kemampuan tersebut didasarkan pada hasil uji kualitatif dan kuantitatif yang telah dilakukan. Hasil uji kualitatif menunjukkan nilai indeks proteolitik dari isolat *Candida* G3.2 adalah 0,09. Sedangkan hasil uji kuantitatif menunjukkan kadar tirosin tertinggi dicapai pada hari ke-7 sebesar 0,867. Degradasi protein dapat terjadi karena adanya aktivitas enzim

protease. Sehingga dapat dikatakan bahwa isolat *Candida* G3.2 mampu memproduksi enzim protease.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengoptimalkan enzim protease yang diproduksi oleh isolat *Candida* G3.2 agar terjadi peningkatan aktivitas enzim protease untuk memenuhi kebutuhan protease yang semakin meningkat.

1.2 Rumusan Permasalahan

Permasalahan yang akan dikaji pada penelitian ini adalah berapa masa inkubasi, suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease dari *Candida* G3.2.

1.3 Batasan Masalah

Penelitian ini dibatasi pada:

1. Isolat yang digunakan adalah *Candida* G3.2. Isolat tersebut merupakan isolat terbaik dari hasil uji potensi secara kualitatif dan kuantitatif dari penelitian sebelumnya yang diisolasi dari Kawasan Rhizosfer Mangrove Gunung Anyar, Surabaya.
2. Pengujian dilakukan dalam skala laboratorium.
3. Variasi masa inkubasi yang digunakan adalah 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 dan 168 jam.
4. Variasi pH yang digunakan adalah 4,5, 7 dan 9.
5. Variasi suhu yang digunakan adalah suhu ruang, 45°C dan 55°C
6. Pengujian optimasi produksi enzim didasarkan pada aktivitas enzim yang dihasilkan.
7. Produk hidrolisis protein oleh protease yang dianalisis pada pengukuran aktivitas enzim adalah tirosin.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui masa inkubasi, suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease dari *Candida* G3.2.

1.5 Manfaat

Manfaat penelitian adalah mengetahui informasi mengenai masa inkubasi, suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease sehingga dapat digunakan untuk meningkatkan produksi enzim protease dari *marine yeast* yang dapat diaplikasikan pada berbagai macam industri.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Marine Yeast*

Marine yeast merupakan kelompok *yeast* yang memiliki kemampuan untuk bertahan hidup pada air laut dalam jangka waktu yang lama dan dapat memanfaatkan berbagai macam sumber karbon. *Yeast* yang ditemukan di lingkungan perairan umumnya tidak membentuk spora (*asporogenous*) (Kurtzman dan Fell, 1998). *Marine yeast* pertama kali diisolasi oleh Bernhard Fischer pada tahun 1984 di Samudra Atlantik dan diidentifikasi sebagai *Torula* sp. dan *Mycoderma* sp. (Zaky *et al.*, 2014).

Marine yeast dibedakan menjadi dua kelompok yaitu obligat dan fakultatif. *Marine yeast* obligat merupakan kelompok *yeast* yang habitat asalnya berada di wilayah lautan. Sedangkan *marine yeast* fakultatif merupakan kelompok *yeast* yang habitatnya berasal dari lingkungan lain seperti sungai, tanah atau hutan. Kemungkinan besar kelompok *yeast* tersebut hanyut terbawa arus dari sungai atau sistem pembuangan air menuju laut atau terbawa oleh angin (Kutty dan Phillip, 2008). *Marine yeast* obligat memiliki tingkat toleran yang tinggi terhadap NaCl dan dapat melakukan fermentasi dalam kondisi garam tinggi. Sementara *marine yeast* fakultatif memiliki tingkat toleran NaCl yang rendah pada awalnya tetapi lama kelamaan tingkat tolerannya terhadap NaCl akan semakin tinggi secara bertahap dalam jangka waktu yang lama (Kandasamy *et al.*, 2012).

Genus *marine yeast* yang paling banyak diisolasi dari sedimen di wilayah perairan adalah *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* dan *Candida* (Chen *et al.*, 2009). *Yeast* kelas Ascomycetes, contohnya *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* dan *Saccharomyces*, secara umum ditemukan di perairan dangkal. Sementara *yeast* dari kelas Basidiomycetes, contohnya *Cryptococcus*, *Rhodospordium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, umumnya ditemukan di perairan dalam (Kutty dan Philip, 2008).

Marine yeast dilaporkan mampu memproduksi berbagai macam substansi bioaktif seperti asam amino, glukon, glutathion, toksin, enzim dan vitamin dengan aplikasi potensialnya berada pada bidang makanan, farmasi, kosmetik dan industri kimia lainnya. Oleh karena *marine yeast* mampu bertahan hidup pada lingkungan yang ekstrem maka substansi yang dihasilkan memiliki karakteristik yang unik misalnya enzim dengan tingkat toleransi terhadap garam yang tinggi, stabil pada suhu tinggi atau rendah dan mampu tumbuh pada tekanan atmosfer tinggi (Chi *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2010).

2.2 *Candida* G3.2

Genus *Candida* termasuk dalam kelompok Anamorphic Ascomycetes *yeast* yang tidak menghasilkan askospora dan kelompok *yeast imperfecti* yakni, reproduksi seksualnya belum jelas (van-Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998).

Candida G3.2 merupakan *marine yeast* yang diisolasi dari Kawasan Rhizosfer Mangrove Gunung Anyar, Surabaya yang memiliki kadar salinitas 25‰ dan pH 6. Koloni dari *Candida* G3.2 berbentuk circular, warna koloni putih, tepi koloni *entire*, tekstur *viscous*, permukaan kasar. Sel dari *Candida* G3.2 berbentuk oval, berukuran 0,6x1,1 µm, reproduksi vegetatif dengan multilateral budding dan memiliki pseudohifa. Pada media cair, *Candida* G3.2 membentuk pelikel di permukaan dan sedimen di dasar media. Selain itu, *Candida* G3.2 juga mampu memfermentasi glukosa, galaktosa, laktosa, maltosa dan sorbitol (Alami dan Shovitri, 2015).

Pada penelitian sebelumnya, *Candida* G3.2 dilaporkan memiliki potensi dalam mendegradasi protein. Kemampuan tersebut didasarkan pada hasil uji kualitatif dan kuantitatif yang telah dilakukan. Hasil uji kualitatif menunjukkan nilai indeks proteolitik dari isolat *Candida* G3.2 adalah 0,09. Sedangkan hasil uji kuantitatif menunjukkan kadar tirosin tertinggi dicapai pada hari ke-7 sebesar 0,867 (Alami dan Shovitri, 2015).



Gambar 2.1 Karakteristik makroskopik *Candida* G3.2 (Alami dan Shovitri, 2015).

2.3 *Marine Yeast* Penghasil Protease

Beberapa penelitian melaporkan bahwa terdapat beberapa strain *marine yeast* yang mampu memproduksi enzim protease yaitu *Aureobasidium pullulans* strain 10 (Chi *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007), *Metschnikowia reukaufii* W6b (Li *et al.*, 2010) dan *Rhodotorula mucilaginosa* L7 (Lario *et al.*, 2015).

Aureobasidium pullulans strain 10 diisolasi dari sedimen di Laut Kuning, China. Produksi protease optimal (623,1 U/mg protein; 7,2 U/ml) didapatkan pada medium yang mengandung 100 mL air laut, 2 gr NaNO₃ dan 2,5 gr amilum dengan pH 6, suhu 24,5°C dan masa inkubasi 30 jam (Chi *et al.*, 2007). Berat molekul protease murni (dipurifikasi) dari *A. pullulans* strain 10 adalah 32 kDa. Sementara suhu optimalnya mencapai 45°C dan pH 9. Hal ini menandakan bahwa protease yang dihasilkan adalah protease alkalin atau basa. Sehingga enzim ini dapat diaplikasikan bagi industri yang membutuhkan kondisi basa salah satunya seperti industri detergen. Enzim diaktivasi oleh Cu²⁺ (konsentrasi 1 mM) dan Mn²⁺ dan diinhibisi oleh Hg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ dan Co²⁺ (konsentrasi 1 mM) (Ma *et al.*, 2007). Enzim protease dihasilkan oleh *A. pullulans* strain 10 secara ekstraseluler. Pada protease ekstraseluler, enzim bekerja di luar sel tanpa perlindungan membran dan dinding sel sehingga harus memiliki kestabilan yang tinggi terhadap berbagai pengaruh kimia dan

fisika. Karakteristik ini menyebabkan protease ekstraseluler dapat digunakan dalam berbagai proses industri (Doi dan McGloughlin, 1992).

Marine yeast Metschnikowia reukaufii W6b yang diisolasi dari sedimen Laut Cina Selatan mampu memproduksi protease optimal pada medium yang mengandung 1% glukosa, 1,5% kasein dan 0,5% ekstrak *yeast* dengan pH 4, suhu 25°C dan masa inkubasi 48 jam. Pada kondisi optimal didapatkan aktivitas enzim sebesar 72,5 U/ml. Protease yang dihasilkan oleh strain *yeast* ini merupakan protease intraseluler (*cell bound enzyme*). Pada protease murni didapatkan suhu optimal mencapai 40°C dan pH 3,5. Hal ini menandakan bahwa protease yang dihasilkan oleh *M. reukaufii* W6b adalah protease asam. Protease asam memiliki aplikasi yang potensial di bidang industri fermentasi dan makanan seperti keju (Li *et al.*, 2010).

Produksi enzim protease dari *Rhodotorula mucilaginosa* L7 yang diisolasi dari alga di Samudra Antartika bergantung pada komposisi medium dan dilaporkan optimal ketika glukosa digunakan sebagai sumber karbon, pepton sebagai sumber nitrogen dan kasein sebagai substrat. Protease murni menghasilkan aktivitas yang tinggi pada pH 5 dan suhu 50°C serta stabil dengan adanya konsentrasi NaCl yang tinggi (hingga 3 M) selama 24 jam (Lario *et al.*, 2015).

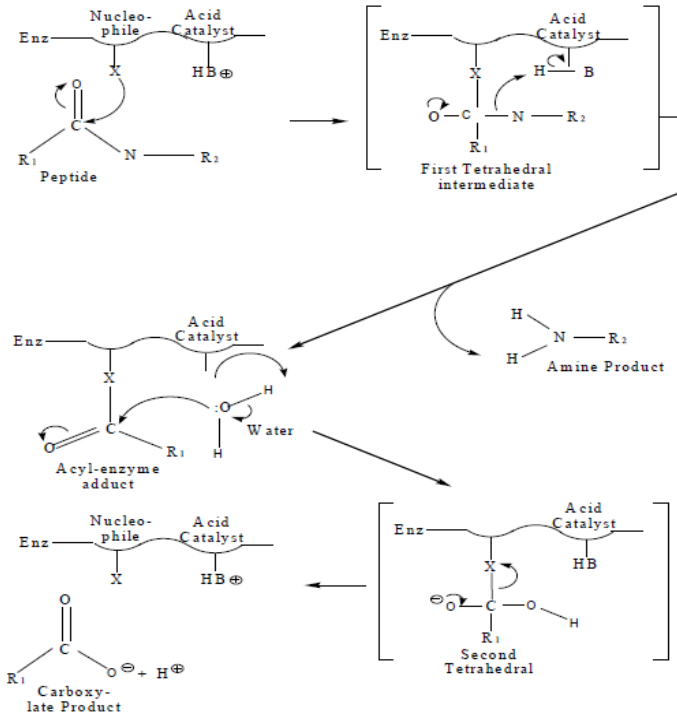
2.4 Protease

Enzim adalah protein yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia. Masing-masing enzim dicirikan oleh spesifitasnya untuk substrat yang mirip. Enzim dapat mempercepat reaksi biokimia secara spesifik tanpa pembentukan produk samping. Dalam reaksi tersebut, enzim mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk suatu senyawa baru yang disebut produk (Lehninger, 1982). Enzim termasuk metabolit primer. Metabolit primer adalah produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba (Sunarminingsih, 2002).

Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim secara intraseluler dan ekstraseluler. Enzim intraseluler merupakan enzim yang diproduksi di dalam sel mikroorganisme. Sedangkan enzim ekstraseluler merupakan enzim yang disekresikan oleh mikroorganisme ke lingkungan luar sel untuk menghidrolisis molekul primer yang ada di lingkungan (Kent, 2000). Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan luar sel dengan filtrasi ataupun sentrifugasi. Sementara enzim intraseluler dapat diekstrak dari dalam sel lewat proses pemecahan sel (Drauz *et al.*, 2012).

Protease (EC 3.4) disebut juga peptidase atau proteinase merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana seperti oligopeptida pendek atau asam amino. Enzim ini bekerja mengkatalisis reaksi hidrolisis pada ikatan peptida pada protein (Poliana dan MacCabe, 2007).

Hidrolisis ikatan peptida adalah suatu reaksi yang melibatkan pemindahan gugus fungsional peptida ke molekul air. Mekanisme umum reaksi hidrolisis yang melibatkan enzim serta substrat peptida secara umum ditunjukkan pada Gambar 2.1. Protease dalam reaksi hidrolisis ini bertindak sebagai nukleofili yang secara umum akan bereaksi dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida sehingga membentuk intermediet tetrahedral. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air sehingga terbentuk intermediet tetrahedral kedua. Pada akhir reaksi dihasilkan produk berupa peptida yang mengandung asam amino, proton dan enzim yang telah diregenerasi (Moran *et al.*, 1994 dalam Pakpahan, 2009).



Gambar 2.2 Mekanisme umum hidrolisis enzimatik substrat peptida (Moran *et al.*, 1994 dalam Pakpahan, 2009).

Secara umum, enzim protease dapat dibedakan atas endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida pada bagian dalam rantai polipeptida. Sedangkan eksopeptidase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan peptida pada ujung rantai polipeptida (Rao, 1998).

Menurut *The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, protease diklasifikasikan dalam subkelas 4 dari kelas 3 (hidrolase). Berdasarkan mekanisme katalitiknya, protease dapat dikelompokkan menjadi beberapa grup yaitu protease aspartik,

protease sistein, protease metal, atau protease yang belum diketahui mekanisme katalitiknya (Motyan *et al.*, 2013).

Tabel 2.1 Klasifikasi umum protease dengan kode E.C dan mekanisme spesifik tiap subgrup (Jisha *et al.*, 2013)

Protease	E.C	Mekanisme
Exopeptidases	3, 4, 11-19	Memotong ikatan peptida pada bagian luar rantai polipeptida
Aminopeptidases	3, 4, 11	Bertindak pada N-terminal bebas untuk membebaskan residu asam amino tunggal
Dipeptidases	3, 4, 13	Exopeptidases spesifik untuk dipeptida
Dipeptidyl peptidase	3, 4, 14	Pelepasan dipeptida N-terminal dari polipeptida
Tripeptidyl peptidase	3, 4, 14	Pelepasan tripeptide N-terminal dari polipeptida
Peptidyl-dipeptidase	3, 4, 15	Pelepasan C-terminus bebas untuk membebaskan dipeptida
Carboxypeptidase	3, 4, 16-18	Pelepasan residu tunggal C-terminal dari polipeptida.
Serine type protease	3, 4, 16	Carboxypeptidase yang memiliki sisi aktif serin
Metalloprotease	3, 4, 17	Carboxypeptidase yang menggunakan ion metal dalam mekanisme katalitiknya
Cysteine type protease	3, 4, 18	Carboxypeptidase yang memiliki sistein pada sisi aktifnya
Omega peptidases	3, 4, 19	Menghilangkan residu yang terikat pada ikatan isopeptida
Endopeptidases	3, 4, 21-24	Memotong ikatan peptida bagian dalam
Serine protease	3, 4, 21	Endopeptidase yang memiliki sisi aktif serin
Cysteine protease	3, 4, 22	Memiliki sistein pada sisi aktifnya

Lanjutan Tabel 2.1 Klasifikasi umum protease dengan kode E.C dan mekanisme spesifik tiap subgrup (Jisha *et al.*, 2013)

Protease	E.C	Mekanisme
Aspartic protease	3, 4, 23	Memiliki residu asam aspartat untuk aktivitas katalitiknya
Metalloprotease	3, 4, 24	Menggunakan ion metal pada mekanisme katalitiknya
Endopeptidases yang belum diketahui	3, 4, 99	Bertindak pada ikatan peptida

2.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Protease

Produksi protease dari mikroorganisme banyak dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, suhu dan masa inkubasi (Pant *et al.*, 2015). Masa inkubasi yang sesuai akan menghasilkan produksi protease yang maksimum ditandai dengan tingginya aktivitas enzim yang dihasilkan. Masa inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan enzim protease untuk memecah protein menjadi asam amino dan peptida sederhana lainnya (Yuniati *et al.*, 2015).

Enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Tiap-tiap enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki suhu optimum yang berbeda-beda berkaitan dengan karakteristik masing-masing mikroorganisme tersebut. Suhu selama proses produksi enzim dilaporkan berkaitan dengan pertumbuhan mikroorganisme tersebut tetapi terkadang suhu optimum untuk memproduksi enzim tidak sama dengan suhu optimum pertumbuhan (Yada, 2015). Suhu dapat mempengaruhi produksi enzim dengan mengubah sifat fisik dari membran sel (Nisha dan Divakaran, 2014).

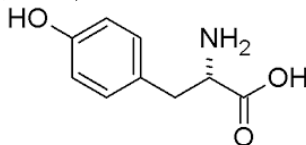
Menurut Stuart (2005), pH medium juga berpengaruh terhadap produksi enzim. Konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur tiga dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki pH optimum dimana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Berdasarkan pHnya, protease dikategorikan menjadi 3 yaitu protease asam, protease netral dan protease basa/alkalin (Mathew dan Gunathilaka, 2015). Protease

asam menunjukkan aktivitas optimal pada pH 2-5, protease netral pada pH 7 dan protease basa pada pH 8 ke atas (Alnahdi, 2012).

2.6 Aktivitas Enzim Protease

Pengujian optimasi produksi enzim protease didasarkan pada aktivitas enzim yang dihasilkan. Aktivitas enzim didefinisikan oleh *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry* sebagai jumlah enzim yang mengkatalisis perubahan substrat menjadi produk pada laju 1 μmole per menit (Meyers, 1995). Tujuan dari pengukuran aktivitas enzim umumnya untuk menentukan jumlah enzim yang ada pada suatu reaksi dalam kondisi yang ditentukan sehingga aktivitas enzim yang didapat dapat dibandingkan antara sampel satu dengan sampel lainnya (Scopes, 2002). Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan Unit (Eisenthal dan Danson, 2002).

Aktivitas protease merupakan uji kemampuan protease untuk mengkatalisis hidrolisis protein sehingga menghasilkan produk berupa asam amino. Semakin besar asam amino yang dihasilkan dari proses hidrolisis protein tersebut maka dapat dikatakan bahwa protease tersebut memiliki aktivitas yang tinggi (Yusriah dan Kuswytasari, 2013). Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 μmole tirosin per menit pada kondisi uji yang ditentukan (Suganthi *et al.*, 2013). Tirosin merupakan salah satu asam amino yang memiliki struktur aromatik (cincin) pada rantai sampingnya (Elrod, 2007).



Gambar 2.3 Struktur kimia tirosin (Elrod, 2007).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).

3.2 Metode Yang Digunakan

3.2.1 Subkultur isolat *Candida* G3.2

Isolat *marine yeast* yang diujikan dalam penelitian ini adalah isolat koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS yang didapatkan dari penelitian sebelumnya (Alami dan Shovitri, 2015). Isolat tersebut diisolasi dari Kawasan Rhizosfer Mangrove Gunung Anyar, Surabaya dengan kode G3.2 dan dugaan genus *Candida*. Isolat *marine yeast* disubkultur pada medium YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*) (Lampiran 1). Medium YMEA steril dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 mL. Tabung reaksi tersebut kemudian diletakkan pada posisi miring dengan sudut 30° dan didinginkan sampai medium memadat lalu disimpan pada suhu ruang. Selanjutnya, isolat *yeast* diinokulasikan pada medium YMEA *slant* menggunakan jarum ose secara aseptis dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang.

Keberhasilan subkultur ditandai dengan pertumbuhan koloni pada bekas pola *streak* atau gores pada medium (Harley dan Prescott, 2002).

3.2.2 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat *Candida* G3.2

Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk menentukan umur kultur starter. Kurva pertumbuhan diamati dengan cara mengukur kepadatan sel *yeast*. Isolat G3.2 dari YMEA *slant* disuspensikan ke dalam 100 mL air fisiologis steril 0,85% hingga didapatkan nilai Optical Density (OD) 0,5 pada panjang gelombang 600 nm (Lundblad dan Struhl, 2008). Kultur

dari suspensi *yeast* diambil sebanyak 20 mL dan ditambahkan ke dalam medium YMB (Yeast Malt Broth) (Lampiran 2) sebanyak 180 mL kemudian diinkubasi dalam *rotary shaker* pada suhu ruang. Kultur dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak ± 2 mL dan diukur nilai OD menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm setiap 12 jam sekali selama 204 jam. Data OD yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai nilai OD. Setelah diketahui fase pertumbuhannya, maka umur starter (μ) dapat ditentukan yaitu pada fase eksponensial (Jisha et al., 2013).

3.2.3 Pembuatan medium produksi enzim protease

Enzim protease diproduksi dalam medium *Czapek Dox Broth* yang mengandung 30 gr sukrosa, 10 gr kasein, 3 gr NaNO_3 , 1 gr KH_2PO_4 , 0,5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 gr KCl dan 0,01 gr FeSO_4 yang dilarutkan dalam 1 liter akuades. Medium ini dimodifikasi dari Chandasekaran dan Sathiyabama (2013). Setelah itu, medium ditambahkan dengan kloramfenikol sebanyak 100 mg/L (Foster et al., 2004). Setelah homogen, medium disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.2.4 Optimasi produksi enzim protease

Persiapan medium prekultur

Penggunaan medium prekultur bertujuan untuk aklimatisasi isolat *marine yeast*. Medium prekultur yang digunakan adalah medium produksi protease. Isolat G3.2 dari YMEA *slant* disuspensikan ke dalam 100 mL air fisiologis steril hingga didapatkan nilai OD 0,5 pada panjang gelombang 600 nm. Kultur dari suspensi *yeast* sebanyak 10 mL ditambahkan ke dalam 90 mL medium produksi protease steril. Kultur kemudian diinkubasi selama μ jam dalam *rotary shaker* pada suhu ruang.

Optimasi waktu inkubasi

Kultur *yeast* dari medium prekultur diinokulasikan sebanyak 10 mL ke dalam *Erlenmeyer* yang telah berisi 90 mL medium produksi enzim protease. Medium produksi yang telah ditambahkan dengan kultur *yeast* kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 0

jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, 120 jam, 144 jam dan 168 jam dalam *rotary shaker* pada suhu ruang.

Optimasi pH dan Suhu

Optimasi pH dan suhu terhadap produksi enzim protease dari *Candida* G3.2 diuji dengan cara mengkombinasikan kedua faktor tersebut. Variasi pH awal medium yang ditentukan adalah 4,5, 7 dan 9. Penentuan pH awal medium dilakukan dengan cara menambahkan sistem *buffer* berikut: *buffer* sitrat untuk pH 4,5, *buffer* fosfat untuk pH 7 dan *buffer* tris-HCl untuk pH 9 (Lakshmi *et al.*, 2014). Sedangkan variasi suhu inkubasi yang digunakan yaitu suhu ruang, 45°C dan 55°C.

Kultur *yeast* dari medium prekultur diinokulasikan sebanyak 10 mL ke dalam *Erlenmeyer* yang telah berisi 90 mL medium produksi enzim protease. Medium produksi yang telah ditambahkan dengan kultur *yeast* kemudian diinkubasi sesuai dengan variasi kombinasi pH dan suhu yang telah ditentukan pada *thermo shaker* dalam waktu inkubasi optimal yang didapatkan dari tahapan sebelumnya.

3.2.5 Pembuatan kurva standar tirosin

Kurva standar tirosin dibuat dari larutan stok tirosin dengan cara melarutkan 30 mg tirosin dalam 100 mL akuades sehingga larutan stok tersebut memiliki konsentrasi 0,3 mg/mL atau setara dengan 1650 μM . Selanjutnya, larutan stok tirosin diencerkan menjadi beberapa variasi konsentrasi yaitu 100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM dan 600 μM . Variasi konsentrasi dibuat dengan cara mengambil larutan standar tirosin 0,3 mg/mL sebanyak 0,6 mL; 1,2 mL; 1,8 mL; 2,4 mL; 3 mL dan 3,6 mL lalu diencerkan dengan aquades sampai 10 mL. Setiap konsentrasi tersebut diambil 0,2 mL kemudian ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 0,5M dan diinkubasi selama 10 menit. Larutan kemudian ditambahkan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu dan diinkubasi selama 30 menit. Masing-masing konsentrasi kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm (Enyard, 2008). Hasil absorbansi

yang diperoleh kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan regresi liniernya.

3.2.6 Produksi enzim protease

Pada akhir waktu inkubasi, masing-masing kultur produksi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan filtrat dengan supernatannya (Chi *et al.*, 2007). Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak *crude* enzim yang selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas protease.

3.2.7 Uji aktivitas enzim protease

Pengujian aktivitas ekstrak *crude* enzim protease dilakukan dengan metode Enggel *et al.* (2004). *Crude* enzim sebanyak 0,25 mL ditambahkan dengan 0,25 mL buffer fosfat pH 7 dan dipreinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Larutan selanjutnya ditambahkan dengan 0,25 mL substrat (2% kasein dalam buffer fosfat pH 7). Larutan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah 10 menit, reaksi dihentikan dengan penambahan reagen (*Trichloro Acetic Acid*) TCA 3% sebanyak 0,5 mL. Campuran larutan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dari hasil sentrifugasi tersebut diambil sebanyak 0,2 mL lalu ditambahkan 1 mL Na₂CO₃ 0,5M dan diinkubasi selama 10 menit. Larutan kemudian ditambahkan dengan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm. Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk melepaskan 1 μmol tirosin dari substrat kasein per menit pada kondisi uji yang ditentukan.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menginterpolarisasikan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan linear kurva standar tirosin kemudian dihitung dengan rumus berikut.

$$SA = \frac{x \cdot V}{t \cdot s}$$

Keterangan:

- SA : aktivitas enzim (unit/mL)
x : konsentrasi tirosin (μmol)
V : volume total reaksi (mL)
t : waktu reaksi (menit)
s : volume enzim (mL)

3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Desain penelitian menggunakan rancangan faktorial yang terdiri dari dua faktor yang saling dikombinasikan. Faktor tersebut adalah pH (4,5; 7; 9) dan suhu (suhu ruang; 45°C; 55°C). Selanjutnya diperoleh 9 kombinasi perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali sehingga terdapat 18 perlakuan. Data aktivitas enzim dari optimasi suhu dan pH dianalisis secara statistik menggunakan Anova Two-Way. Sedangkan data aktivitas enzim dari optimasi masa inkubasi dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL dan PEMBAHASAN

4.1 Kurva Pertumbuhan *Candida* G3.2

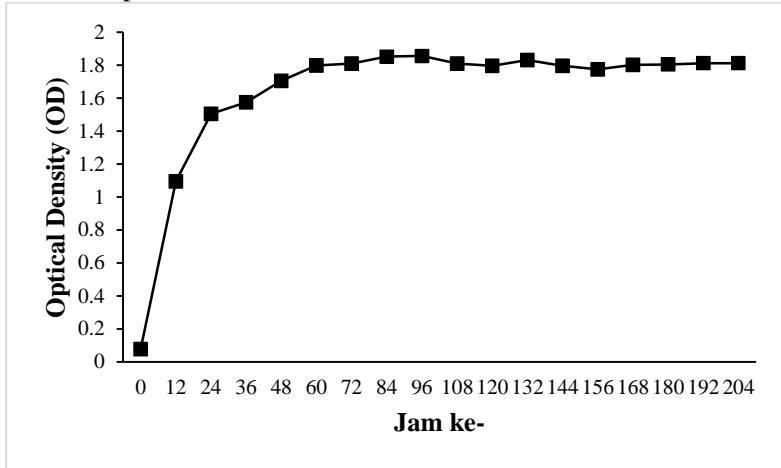
Kurva pertumbuhan *Candida* G3.2 diperlukan untuk menentukan umur starter terbaik yang digunakan untuk produksi enzim protease. Isolat *Candida* G3.2 dikultivasi pada medium *Yeast Malt Broth* (YMB). Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan tiap 12 jam dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm.

Gambar 4.1 menunjukkan profil kurva pertumbuhan *Candida* G3.2 tidak tampak adanya fase lag yang merupakan fase pertama kurva pertumbuhan mikroorganisme pada umumnya. Hal ini disebabkan pengukuran OD dilakukan setiap 12 jam. Fase lag merupakan fase adaptasi dimana sel mikroba menyesuaikan diri terhadap kondisi lingkungan yang baru (Rolfe *et al.*, 2011). Pada fase ini, sel aktif secara biokimia tetapi tidak membelah (Patil *et al.*, 2008).

Fase eksponensial *Candida* G3.2 terjadi pada jam ke-0 sampai ke-60. Ketersediaan nutrisi yang cukup memungkinkan sel untuk melakukan pembelahan sehingga jumlah sel meningkat secara cepat (Patil *et al.*, 2008). Selain itu mikroba juga banyak memproduksi metabolit primer pada fase ini (Sanchez dan Demain, 2008), salah satunya adalah enzim protease. Fase eksponensial merupakan fase paling sesuai untuk starter dikarenakan aktivitas metabolisme berlangsung secara aktif dan optimum serta dapat mensintesis bahan dengan cepat dan dalam jumlah konstan (Purkan, 2014).

Fase stasioner terjadi pada jam ke-60 sampai ke-204. Fase ini menunjukkan keadaan jumlah sel yang hidup relatif seimbang dengan jumlah sel yang mati. Metabolisme *yeast* semakin melambat disebabkan oleh nutrisi yang disediakan dalam medium terbatas. Selain itu adanya akumulasi produk buangan dari hasil metabolisme yang bersifat toksik bagi sel dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel tersebut (Pepper *et al.*, 2015).

Oleh karena itu, pertumbuhan sel pada fase ini cenderung mendatar pada kurva.



Gambar 4.1 Profil kurva pertumbuhan *Candida* G3.2

Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 4.1 dapat diketahui umur kultur starter yang digunakan untuk produksi enzim protease adalah 30 jam setelah inokulasi dimana merupakan fase eksponensial.

4.2 Optimasi Produksi Enzim Protease

Uji aktivitas protease pada penelitian ini digunakan kasein yang berfungsi sebagai substrat. Kasein akan terhidrolisis oleh protease menjadi asam amino (Soeka dan Sulistiani, 2014) dimana salah satunya adalah tirosin. Laju pembentukan asam amino tersebut dijadikan tolak ukur aktivitas katalisis protease. Asam amino yang terbentuk dipisahkan dari substrat yang tidak terhidrolisis dengan penambahan TCA (*trichloroacetic acid*) 3%. TCA mampu melarutkan asam amino sedangkan protein yang memiliki ukuran dan berat molekul besar (tidak terhidrolisis) akan mengendap (Yusriah dan Kuswytasari, 2013). Penambahan TCA ini sekaligus untuk menginaktifkan enzim protease agar proses hidrolisis tidak berlanjut dengan cara menurunkan pH (Wang,

2008). Gugus fenol pada tirosin akan bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu menghasilkan larutan berwarna biru (Prasad, 2011).

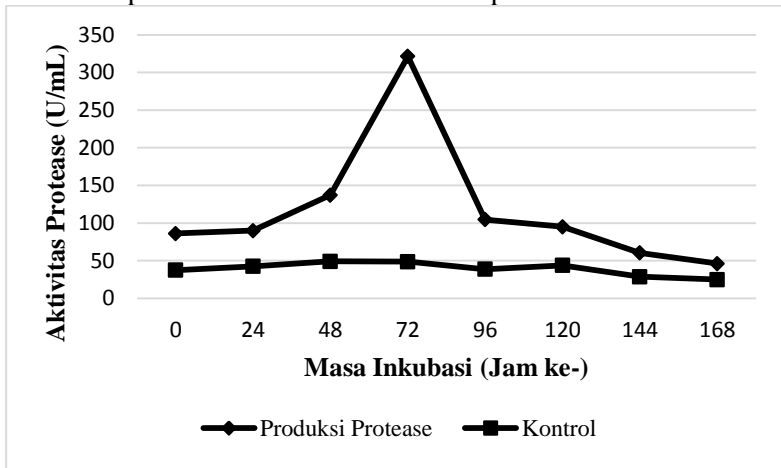
4.2.1 Optimasi masa inkubasi

Pengujian pengaruh masa inkubasi bertujuan untuk menentukan masa inkubasi yang dapat menghasilkan produksi enzim protease optimal dari *Candida* G3.2. Isolat *Candida* G3.2 dikultivasi pada medium basal Czapek's Dox Broth dengan masa inkubasi selama 0 sampai 168 jam pada suhu ruang. Uji aktivitas enzim dilakukan tiap 24 jam sekali.

Hasil pengujian pada Gambar 4.2 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas protease dari jam ke-0 sebesar 86,125 U/mL hingga mencapai aktivitas protease optimal pada jam ke-72 sebesar 321,5 U/mL. Meningkatnya nilai aktivitas protease diduga disebabkan oleh tingginya aktivitas metabolisme sel *yeast* dalam melakukan pembelahan sel dan sintesis enzim. Apabila jumlah sel meningkat maka sekresi enzim semakin banyak sehingga aktivitas protease pun juga akan meningkat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Das (2013) dimana sekresi enzim bergantung pada jumlah sel dan fase pertumbuhan mikroorganisme spesifik. Enzim ekstraseluler disintesis oleh mikroorganisme selama fase eksponensial sampai fase stasioner mengikuti pola kurva pertumbuhannya. Aktivitas enzim tertinggi dicapai seiring berakhirnya fase eksponensial dalam kurva pertumbuhan (Ire *et al.*, 2011). Hal ini juga didukung oleh Qadar *et al.* (2009) dan Kumaraswamy *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa produksi enzim protease optimal dicapai pada fase akhir eksponensial atau fase awal stasioner.

Setelah 72 jam terjadi penurunan aktivitas protease secara bertahap sampai jam ke 168 hingga mencapai nilai aktivitas sebesar 46,125 U/mL. Penurunan aktivitas protease tersebut dapat disebabkan karena tidak tersedia nutrisi dan substrat yang cukup dalam medium produksi (Srividya dan Mala, 2009). Nutrisi dan substrat yang menipis mengakibatkan jumlah enzim yang disekresikan juga menurun. Menurunnya aktivitas protease juga

dapat terjadi seiring dengan autolisis sel akibat adanya akumulasi berbagai enzim di dalam medium (Olajuyigbe, 2013). Selain itu, *crude* enzim apabila terlalu lama dibiarkan dalam medium produksi akan menjadi tidak stabil (Rabelo *et al.*, 2011). Sehingga dapat diketahui bahwa jam ke-72 merupakan masa inkubasi optimum untuk ekstraksi enzim protease.



Gambar 4.2 Grafik pengaruh masa inkubasi terhadap produksi enzim protease dari *Candida* G3.2

Pada kontrol ditunjukkan bahwa kadar tirosin yang terukur jauh lebih rendah daripada perlakuan (medium produksi dengan kultur) dengan kisaran nilai aktivitasnya hanya sebesar 0-50 U/mL (Gambar 4.2). Adanya nilai kadar tirosin pada kontrol disebabkan oleh penambahan kasein pada medium sebagai *inducer*. Kasein mengandung tirosin dalam jumlah kecil sekitar 0,5% (Watanabe *et al.*, 1992). Kontrol dalam penelitian ini merupakan medium produksi tanpa kultur *yeast*.

Masa inkubasi protease optimal oleh *Candida* G3.2 ini terbilang cukup pendek dibandingkan penelitian lainnya. Nelson dan Young (1987) melaporkan bahwa produksi protease optimal oleh *Candida olea* mampu dicapai pada hari ke-5 dengan aktivitas enzim sebesar 115 U/mL. Sementara *Candida humicola*

mampu menghasilkan aktivitas protease optimal hanya sebesar 17 U/mL pada hari ke-4 inkubasi (Ray *et al.*, 1992).

4.2.2 Optimasi suhu dan pH

Pengujian ini bertujuan untuk menentukan suhu dan pH optimal yang dapat menghasilkan produksi enzim protease dari *Candida* G3.2. Isolat *Candida* G3.2 dikultivasi pada medium basal Czapek's Dox Broth yang telah ditentukan kombinasi pH dan suhunya selama 3 hari.

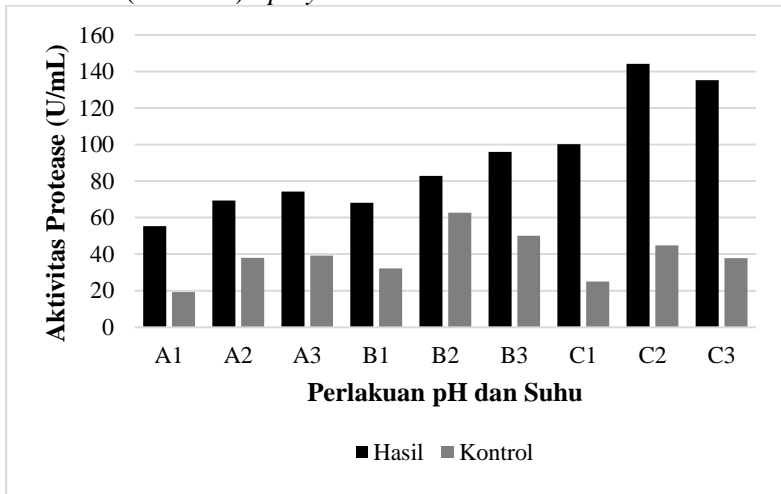
Hasil pengujian secara statistik menggunakan ANOVA Two-Way menyatakan bahwa terdapat pengaruh antara suhu dengan aktivitas protease dengan nilai P-value 0,000 (P-value < 0,05) dan pH dengan aktivitas protease dengan nilai P-value 0,039 (P-value < 0,05). Namun tidak terdapat pengaruh interaksi antara suhu dan pH terhadap aktivitas protease dengan nilai P-value 0,691 (P-value > 0,05) (Lampiran 8).

Uji lanjut pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan uji Tukey tanpa memperhatikan variabel pH, diperoleh hasil bahwa suhu 55°C memberikan hasil aktivitas tertinggi dan berbeda signifikan bila dibandingkan dengan suhu ruang dan 45°C (Lampiran 8). Sehingga pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa suhu 55°C merupakan suhu optimum untuk produksi protease.

Pada Gambar 4.3 ditunjukkan bahwa peningkatan suhu berbanding lurus dengan nilai aktivitas protease. Suhu sangat mempengaruhi sintesis enzim baik secara non spesifik dengan mempengaruhi laju reaksi biokimia atau secara spesifik dapat menginduksi atau menekan produksi enzim tersebut (Rahman *et al.*, 2004). Hal ini diperkuat dengan pernyataan Ray *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa suhu dapat meregulasi sintesis dan sekresi protease ekstraseluler. Pada penelitian ini, kenaikan suhu menginduksi sekresi protease yang berbanding lurus dengan nilai aktivitas protease. Suhu mampu meregulasi sintesis enzim pada tahap transkripsi mRNA dan dimungkinkan pula pada tahap translasi (Votruba *et al.*, 1991). Untuk enzim ekstraseluler, suhu

dapat mempengaruhi sekresi enzim dimungkinkan dengan mengubah sifat fisik dari membran selnya (Rahman *et al.*, 2004).

Suhu optimum enzim protease yang diproduksi oleh tiap strain mikroba berbeda-beda. Beberapa strain *yeast* mampu memproduksi protease dengan suhu optimum relatif tinggi. Hasil penelitian Li *et al.* (2009) menunjukkan bahwa *marine yeast Cryptococcus aureus* HN4.9 mampu memproduksi protease dengan suhu optimumnya 50°C. Levin dan Witkowski (1991) juga melaporkan bahwa suhu optimum *crude* protease dari *Yarrowia (Candida) lipolytica* CL1 dan CL2 adalah 50°C.



Gambar 4.3 Grafik pengaruh suhu dan pH terhadap produksi enzim protease dari *Candida* G3.2

Keterangan gambar: (A1= suhu ruang+pH 4,5; A2= suhu ruang+pH 7; A3= suhu ruang+pH 9; B1= suhu 45°C+pH 4,5; B2= suhu 45°C+pH 7; B3= suhu 45°C+pH 9; C1= suhu 55°C+pH 4,5; C2= suhu 55°C+pH 7; C3=suhu 55°C+pH 9)

Hasil uji Tukey untuk pengaruh pH terhadap produksi protease tanpa memperhatikan variabel suhu, diperoleh hasil bahwa pH 9 memberikan hasil aktivitas tertinggi dan berbeda signifikan dengan pH 4,5 namun tidak berbeda signifikan dengan pH 7 (Lampiran 8). Sehingga pada penelitian ini dapat dikatakan

bahwa pH 9 merupakan pH optimum untuk produksi protease. Hal ini dimungkinkan berkaitan dengan habitat dari *marine yeast* itu sendiri. Pada penelitian ini, *Candida* G3.2 diisolasi dari kawasan mangrove Gunung Anyar, Surabaya dimana pada umumnya, perairan di kawasan mangrove cenderung basa (Rahman et al., 2013).

Pada Gambar 4.3 ditunjukkan bahwa semakin meningkat pH medium maka aktivitas protease juga relatif meningkat. pH medium kultur sangat mempengaruhi reaksi enzimatik serta transportasi senyawa yang melewati membran sel dimana pH berkaitan terhadap konsentrasi ion hidrogen yang terdapat pada medium (Rupali, 2015). pH diketahui mampu mempengaruhi sekresi protease dalam medium produksi. pH medium mempengaruhi ketersediaan ion metabolik tertentu dan permeabilitas membran sel mikroorganisme dimana keduanya akan mendukung pertumbuhan sel dan produksi enzim (Gomaa, 2013). Hal ini diperkuat oleh Bhunia *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa variasi pH dapat mengubah kesetimbangan asam-basa dan aliran berbagai nutrien dan inducer.

Tiap strain mikroorganisme memiliki pH optimum yang berbeda-beda untuk dapat memproduksi protease. Berdasarkan produksi optimumnya, protease yang dihasilkan oleh *Candida* G3.2 tergolong dalam protease alkalin (pH 9). Beberapa *yeast* lain juga dilaporkan mampu memproduksi protease serupa antara lain *Candida olea* 148 dengan pH optimum berada di antara pH 8 dan 9 (Nelson dan Young, 1987), *Yarrowia (Candida) lipolytica* dengan aktivitas optimalnya dicapai antara pH 9 dan 10 (Ogrydziak, 1988; Bessadok *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2009), *Aureobasidium pullulans* HN3.11, *Issatchenkia orientalis* FY04C dan *Cryptococcus cf. Aureus* HN4.9 dengan pH optimumnya adalah 9 (Li et al., 2009).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah *Candida* G3.2 mampu memproduksi enzim protease secara optimal pada masa inkubasi 72 jam dengan nilai aktivitas sebesar 321,5 U/mL. Kombinasi suhu dan pH yang optimal untuk produksi enzim protease adalah pada suhu 55°C dan pH 9 dengan nilai aktivitas sebesar 135,25 U/mL.

5.2 Saran

1. Perlu penelitian lanjutan mengenai faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi produksi enzim protease.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai purifikasi dan karakterisasi enzim protease yang diproduksi oleh *Candida* G3.2.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

Adrio, J.L dan Demain, A.L. 2014. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules** 4: 117-139.

Alami, N.H dan Shovitri, M. 2015. Studi Lanjut Marine Yeast sebagai Biofertilizer Komersial. **Laporan Akhir Penelitian Pemula**. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.

Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and Screening of Extracellular Proteases Produced by New Isolated *Bacillus* sp. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 2(9): 071-074.

Ayaz, N.O. 2012. Formation of Proteases from Newly Isolated Strain Isolated from Saudi Arabia. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 2(8): 190-193.

Beg, Q.K., Sahai, V. dan Gupta, R. 2003. Statistical Media Optimization and Alkaline Protease Production from *Bacillus mojavensis* in a Bioreactor. **Process Biochemistry** 39: 203.

Bessadok, B., Masri, M., Breuck, T. Dan Sadok, S. 2015. Isolation and Screening for Protease Activity by Marine Microorganisms. **Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer de Salammbô** 42: 21-23.

Bhunja, B., Basak, B. dan Dey, A. 2012. A Review on Production of Serine Alkaline Protease by *Bacillus* spp. **Journal of Biochemical Technology** 3(4): 448-457.

Bizuye, A., Sago, A., Admasu, G., Getachew, H., Kassa, P., dan Amsaya, M. 2014. Isolation, Optimization and Characterization of Protease Producing Bacteria from Soil and Water in Gondar town,

North West Ethiopia. **International Journal of Bacteriology, Virology and Immunology** 1(3): 020-024.

Chandrasekaran, M. dan Sathiyabama, M. 2013. Production, Partial Purification and Characterization of Protease from a Phytopathogenic Fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer. **Journal of Basic Microbiology** 54(8): 763-774.

Chen, Y.S., Yaganida, F., dan Chen, L.Y. 2009. Isolation of Marine Yeasts from Coastal Waters of Northeastern Taiwan. **Aquatic Biology** 8: 55–60.

Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., dan Wang, X. 2009. Production, Characterization and Gene Cloning of the Extracellular Enzymes from the Marine-Derived Yeasts and Their Potential Applications. **Biotechnology Advances** 27: 236–255.

Chi, Z.C., Ma, P., dan Wang, H.F. 2007. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Alkaline Protease Production by the *Marine Yeast Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology** 98: 534–538.

Choudhary, V., dan Jain, P.C. 2012. Optimization of Process Parameters for Alkaline Protease Production by *Aspergillus versicolor* PF/F/107. **Journal of Academia and Industrial Research** 1(1).

Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. **Journal of Visualized Experiment** 19:899.

Das, A., Paul, T., Halder, S.K., Maity, C., Mohapatra, P.K.D., Pati, B.R. dan Mondal, K.C. 2013. Study on Regulation of Growth and Biosynthesis of Cellulolytic Enzymes from Newly Isolated

Aspergillus fumigatus ABK9. **Journal of Microbiology** 62(1): 31-43.

Doi, R.H. dan McGloughlin, M. 1992. **Biology of Bacilli: Applications to Industry**. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Drauz, K., Groger, H., dan May, O. 2012. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis Volume 1**. Germany: Wiley-VCH.

Eisenthal, R. dan Danson, M.J. 2002. **Enzyme Assays: A Practical Approach**. United Kingdom: Oxford University Press.

Elrod, S.L. 2007. **Schaum's Genetika Edisi Keempat**. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Enggel J, Meriandini A dan Natalia L.2004. Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. **Jurnal Mikrobiologi Indonesia** 9(1): 9-12.

Foster, M.S., Bills, G.F dan Mueller, G.M. 2004. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**. USA: Elsevier Academic Press.

Gomaa, E.Z. 2013. Optimization and Characterization of Alkaline Protease and Carboxymethyl-cellulase Produced by *Bacillus pumillus* Grown on *Ficus nitida* Wastes. **Brazilian Journal of Microbiology** 44(2): 592-537.

Gupta, V., March, R.L., dan Sreenivasaprasad, S. 2015. **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**. United Kingdom: John Wiley & Sons.

Harley, J.P., dan Prescott, L.M. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition**. The McGraw-Hill Companies. USA.

Ire, F.S., Okolo, B.N., Moneke, A.N. dan Odibo, F.J. 2011. Influence of Cultivation Conditions on the Production of a Protease from *Aspergillus carbonarius* Using Submerged Fermentation. **African Journal of Food Science** 5(6): 353-365.

Jisha, V.N., Smitha, R.B., dan Pradeep, S. 2013. Versatility of Microbial Proteases. **Advances in Enzyme Research** 1: 39-51.

Kandasamy, K., Alikunhi, N.M., dan Subramanian, M. 2012. Yeasts in Marine And Estuarine Environments. **Journal of Yeast and Fungal Research** 3(6): 74 – 82.

Kent, M. 2000. **Advanced Biology**. United Kingdom: Oxford University Press.

Kumaraswamy, M., Kashyap, S., Vijay, R., Tiwari, R. dan Anuradha, M. 2012. Production and Optimization of Extracellular Protease from *Bacillus* sp. Isolated from Soil. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research** 3(2): 564-569.

Kurtzman, C. P dan Fell, J.W. 1998. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Kutty, N.S., dan Phillip, R. 2008. Marine Yeast: a Review. **Yeast** 25: 465–483.

Lakshmi, B.K.M., Sri, P.V.R., Devi, K.A., Hemalatha, K.P.J. 2014. Media Optimization of Protease Production by *Bacillus licheniformis* and Partial Characterization of Alkaline Protease. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 3(5): 650-659.

Lario, L.D., Chaud, L., Almeida, M.G., Sette, L.D., dan Pessoa, A. 2015. Production, Purification, and Characterization of an

Extracellular Acid Protease from The Marine Antarctic Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **Fungal Biology** 119: 1129-1136.

Lehninger. 1982. **Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1**. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Levin, R.E dan Witkowski, R. 1991. Characteristics and Identity of Obligately Aerobic Spoilage Yeasts from Fish Silage. **Journal of Applied Bacteriology** 71(4): 354-359.

Li, J., Peng, Y., Wang, X., dan Chi, Z. 2010. Optimum Production and Characterization of an Acid Protease from Marine Yeast *Metschnikowia reukaufii* W6b. **Journal of Ocean University of China** 9 (4): 359-364.

Li, J., Zhenming, C., Xianghong, W., Ying, P. dan Zhe, C. 2009. The Selection of Alkaline Protease-Producing Yeasts from Marine Environments And Evaluation of Their Bioactive Peptide Production. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology** 27(4): 753-761.

Li, Q., Yi, L., Marek, P dan Iverson, B.L. 2013. Commercial Proteases: Present and Future. **FEBS Letters** 587: 1155–1163.

Lundblad, V. and Struhl, K. 2008. Yeast. **Current Protocols in Molecular Biology**. USA: John Wiley and Sons, Inc.

Ma, C., Ni, X., Ma, L. dan Gao, L. 2007. Purification and Characterization of an Alkaline Protease from the *Marine Yeast Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. **Marine Biotechnology** 9(3):343-351.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. dan Brock, T.D. 2006. **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Mathew, C.D dan Gunathilaka, R.M.S. 2015. Production, Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Serine Protease from *Bacillus lichniformis* NMS-1. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research** 6(3): 19-27.

Meyers, R.A. 1995. **Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference**. Canada: Wiley-VCH.

Motyán, J.A., Toth, F., dan Tozser, J. 2013. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules** 3: 923-942.

Najafi, M.F., Deobagkar, D., dan Deobagkar, D. 2005. Potential Application of Protease Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology** 8(2).

Nelson dan Young 1987. Extracellular Acid and Alkaline Proteases from *Candida olea*. **Journal of General Microbiology** 133(6): 1461-1469.

Nelson DL, and Cox MM. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry Third Edition**. New York: Worth Publishers.

Nisha, N.S dan Divakaran, J. 2014. Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus subtilis* NS Isolated from Sea Water. **African Journal of Biotechnology** 13(16): 1707-1713.

Ogrydziak, D.M. 1988. Production of Alkaline Extracellular Protease by *Yarrowia lipolytica*. **CRC Critical Reviews in Biotechnology** 8(3): 177-187.

Ogrydziak, D.M. 1993. Yeast Extracellular Proteases. **Critical Reviews in Biotechnology** 13(1): 1-55.

Olajuyigbe, F.M. 2013. Optimized Production and Properties of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* SHS-04 Grown on Groundnut (*Arachis hypogaea*) Meal. **Advances in Enzyme Research** 1(4): 112-120.

Oyeleke, S.B., Egwim, E.C., and Auta, S.H. 2010. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* Strains for Extracellular Protease Enzyme Production. **Journal of Microbiology and Antimicrobials** 2(7): 83-87.

Pakpahan, R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik Dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatra Utara. **Thesis**. Medan: Universitas Sumatra Utara.

Pant, G., Prakash, A., Pavana, J.V.P., Bera, S., Devirama, G.V.N.S, Kumar, A., Panchpuri, M., dan Prasuna, R.G. 2015. Production, Optimization and Partial Purification of Protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science** 9: 50–55.

Patil, U., Chaudhari, A.B., Kulkarni, J.S. dan Chincholkar, S.B. 2008. **Foundations in Microbiology**. India: Rachana Enterprises.

Pepper, I.L., Gerba, C.P. dan Gentry, T.J. 2015. **Environmental Biology Third Edition**. USA: Elsevier.

Poliana, J., dan MacCabe, A.P. 2007. **Industrial Enzymes: Structure, Function, and Applications**. Dordrecht: Springer.

Prasad, N.K. 2011. **Enzyme Technology: Pacemaker of Biotechnology**. India: PHI Learning Private Limited.

Purkan., Azizah, B., Baktir, A. dan Sumarsih, S. 2014. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik Dari Sampah Organik: Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase. **Jurnal Ilmiah Kimia Molekul** 9(2): 128-135.

Qadar, S.A., Shireen, E., Iqbal, S. dan Anwar, A. 2009. Optimization of Protease Production from Newly Isolated Strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3. **Indian Journal Biotechnology** 8(3): 286-290.

Rabelo, M.C., Fontes, C.M.L. dan Rodrigues, S. 2011. Stability Study of Crude Dextranucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742. **Indian Journal of Microbiology** 51(2): 164-170.

Rahman, M.M., Rahman, M.T., Rahaman, M.S., Rahman, F., Ahmad, J.U, Shakera, B. dan Halim, M.A. 2013. Water Quality of the World's Largest Mangrove Forest. **Canadian Chemical Transactions** 1(2): 141-156.

Rahman, R.N., Geok, L.P., Basri, M. dan Saleh, A.B. 2004. Physical Factors Affecting the Production of Organic Solvent-Tolerant Protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. **Bioresource Technology** 96: 429-436.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., dan Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62 (3): 597-635.

Ray, M.K., Devi, K.U., Kumar, G.S. dan Shivaji, S. 1992. Extracellular Protease from the Antarctic Yeast *Candida humicola*. **Applied and Environmental Microbiology** 58(6): 1918-1923.

Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, Baranyi, J., Peck, M.W., R.P Hinton, J.C. 2011. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. **Journal of Bacteriology** 194(3):686-701.

Rupali, D. 2015. Screening and Isolation of Protease Producing Bacteria from Soil Collected from Different Areas of Burhanpur Region (MP) India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 4(8): 597-606.

Sanchez, S. dan Demain, A.L. 2008. Metabolic Regulation and Overproduction of Primary Metabolites. **Microbial Biotechnology** 1(4): 283–319.

Sarkar, S., Pramanik, A., Mitra, A., dan Mukherjee, J. 2010. Bioprocessing Pata for the Production of Marine Enzymes. **Marine Drugs** 8(4): 1323–1372.

Scopes, R.K. 2002. **Encyclopedia of Life Sciences**. USA: John Wiley and Sons.

Soeka, Y.S dan Sulistiani. 2014. Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis* A1 InaCC B398 Yang Diisolasi Dari Terasi Samarinda. **Berita Biologi** 13(2): 203-212.

Srividya, S. dan Mala, M. 2009. Influence of Process Parameters on the Production of Detergent Compatible Alkaline Protease by a Newly Isolated *Bacillus* sp. Y. **Turkish Journal of Biology** 35(2): 177-182.

Stuart, H. 2005. **Essential Microbiology**. United Kingdom: John Wiley & Sons Inc.

Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A., Gothandam, K.M. 2013. Screening And Optimization of Protease Production from a Halotolerant *Bacillus licheniformis* Isolated from Saltern Sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 11: 47–52.

Sunarminingsih, R. 2002. *Metabolit Sekunder: Manfaat dan Perkembangannya Dalam Dunia Farmasi*. **Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar UGM Jogjakarta**.

Van rij, K.V.N.J.W. 1987. **The Yeast a Taxonomic Study, Third Revised and Enlarge Edition**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Votruba, J., Pazlarova, J., Dvorakova, M., Vachora, L., Strnadova, M., Kucerova, H., Vinter, V., Zourabian, R., Chaloupka, J., 1991. External Factors Involved in the Regulation of Synthesis of an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium*: Effect of Temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology** 35: 352–357.

Wang, F. 2008. **Biomarker Methods in Drug Discovery and Development**. USA: Humana Press.

Watanabe 1992. Phenylalanine Ammonia Lyase from *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodospiridium toruloides*: Application for Phenylalanine and Tyrosine Deamination. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 8(4): 406-410.

Yada, R. 2015. **Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality**. United Kingdom: Woodhead Publishing.

Yuniati, R., Nugroho, T.T., dan Puspita, F. 2015. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. **JOM FMIPA** 1(2).

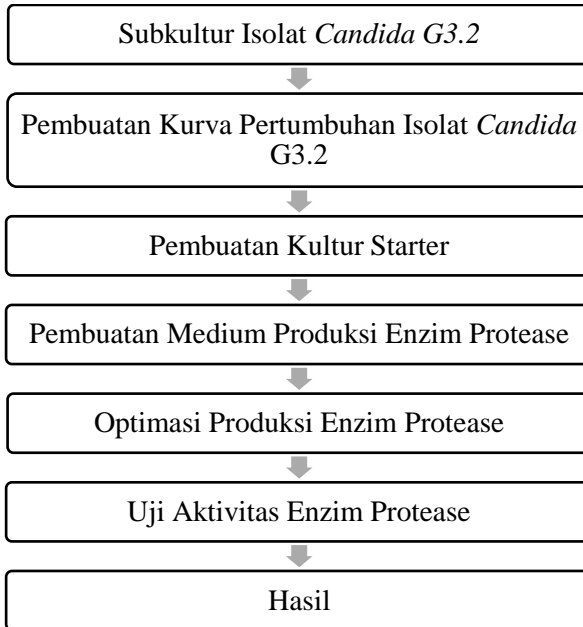
Yusriah dan Kuswytasari, N.D. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. **Jurnal Sains dan Seni Pomits** 2(1):48-50.

Zaky, A.S., Tucker, G.A., Daw, Z.Y., dan Du, C. 2014. Marine Yeast Isolation and Industrial Application. **FEMS Yeast Research** 14: 813-825.

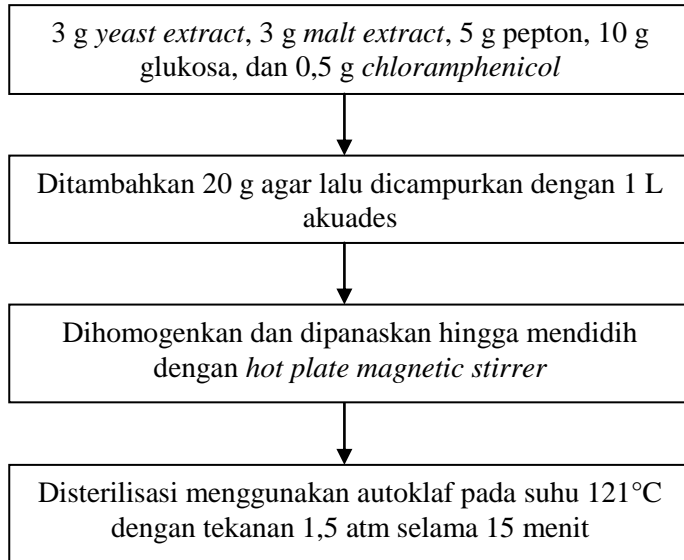
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

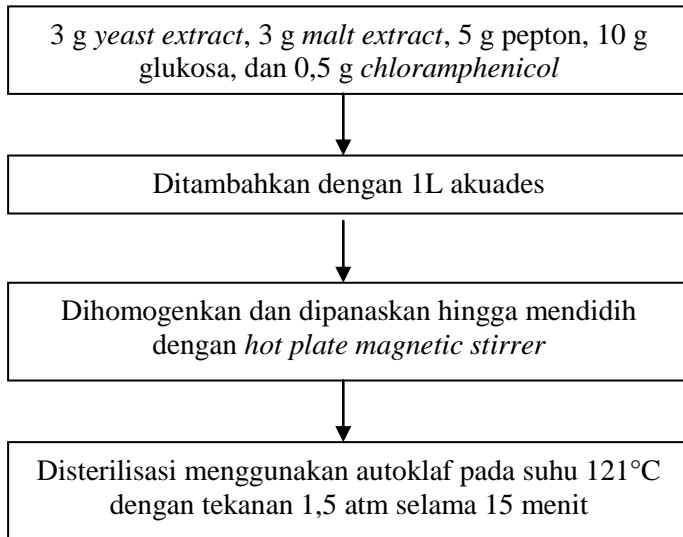
LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Penelitian



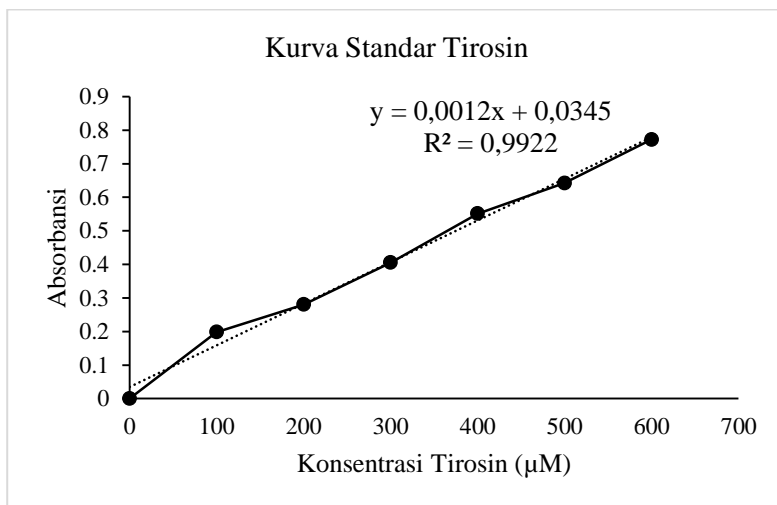
Lampiran 2. Pembuatan Medium YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*)



Lampiran 3. Pembuatan Medium YMB (*Yeast Malt Broth*)

Lampiran 4. Kurva Standar Tirosin

Konsentrasi (μM)	\AA
0	0
100	0,198
200	0,28
300	0,405
400	0,551
500	0,642
600	0,772



Lampiran 5. *Optical Density Kurva Pertumbuhan Candida G3.2*

Jam ke-	Å
0	0,078
12	1,095
24	1,505
36	1,574
48	1,704
60	1,797
72	1,809
84	1,851
96	1,855
108	1,809
120	1,796
132	1,83
144	1,795
156	1,774
168	1,801
180	1,804
192	1,812
204	1,812

Lampiran 6. Hasil Uji Aktivitas Optimasi Masa Inkubasi

Aktivitas Enzim Protease

Inkubasi (Jam ke-)	Å	Rata-Rata Å	Satuan Aktivitas (U/mL)
0	0,328	0,3445	86,125
	0,361		
24	0,318	0,36	90
	0,402		
48	0,549	0,549	137,25
	0,549		
72	1,257	1,286	321,5
	1,315		
96	0,422	0,419	104,75
	0,416		
120	0,38	0,38	95
	0,38		
144	0,21	0,2415	60,375
	0,273		
168	0,272	0,1845	46,125
	0,097		

Aktivitas Kontrol

Inkubasi (Jam ke-)	Å	Satuan Aktivitas (U/mL)
0	0,15	37,5
24	0,17	42,5
48	0,197	49,25
72	0,195	48,75
96	0,155	38,75

120	0,175	43,75
144	0,115	28,75
168	0,1	25

Contoh Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

Berdasarkan kurva standar tirosin yang telah dibuat didapatkan persamaan garis $y = 0,0012x + 0,0345$

Konsentrasi tirosin masa inkubasi jam ke-0

$$y = 0,0012x + 0,0345$$

$$0,3445 = 0,0012x + 0,0345$$

$$x = 287,0833$$

Satuan Aktivitas (U/mL)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{x.V}{t.s} \\
 &= \frac{287,0833 \times 0,75}{10 \times 0,25} \\
 &= 86,125
 \end{aligned}$$

Lampiran 7. Hasil Uji Aktivitas Optimasi Suhu dan pH

Aktivitas Enzim Protease

pH \ Suhu	4,5		7		9	
	Å	SA (U/mL)	Å	SA (U/mL)	Å	SA (U/mL)
Suhu ruang	0,152	55,375	0,233	69,375	0,214	74,25
	0,291		0,322		0,38	
45°C	0,228	68,125	0,311	82,875	0,418	96
	0,317		0,352		0,35	
55°C	0,425	100,125	0,534	144,125	0,516	135,25
	0,376		0,619		0,566	

Aktivitas Kontrol

pH \ Suhu	4,5		7		9	
	Å	SA (U/mL)	Å	SA (U/mL)	Å	SA (U/mL)
Suhu ruang	0,077	19,25	0,152	38	0,157	39,25
45°C	0,129	32,25	0,251	62,75	0,2	50
55°C	0,1	25	0,179	44,75	0,151	37,75

Contoh Perhitungan Aktivitas Enzim Protease

Rata-rata absorbansi pada suhu ruang + pH 4,5

$$\frac{0,152+0,291}{2} = 0,2215$$

Konsentrasi tirosin pada suhu ruang + pH 4,5

$$y = 0,0012x + 0,0345$$

$$0,2215 = 0,0012x + 0,0345$$

$$x = 184,5833$$

Satuan Aktivitas (U/mL)

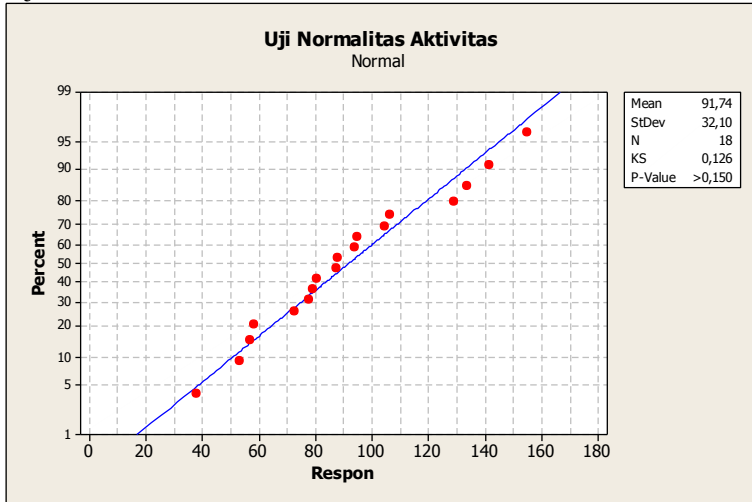
$$= \frac{x \cdot V}{t \cdot s}$$

$$= \frac{184,5833 \times 0,75}{10 \times 0,25}$$

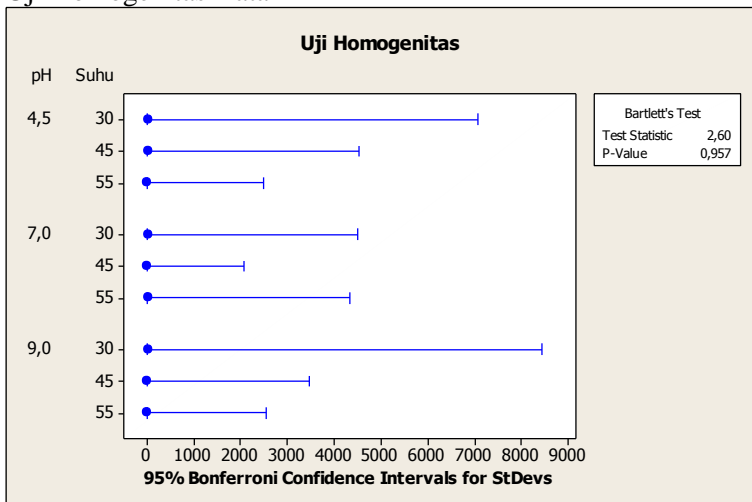
$$= 55,375$$

Lampiran 8. Hasil Analisis Data Anova

Uji Normalitas Data



Uji Homogenitas Data



Uji Anova

General Linear Model: Respon versus pH; Suhu

Factor	Type	Levels	Values
pH	fixed	3	4,5; 7,0; 9,0
Suhu	fixed	3	30; 45; 55

Analysis of Variance for Respon, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
pH	2	2681,3	2681,3	1340,6	4,75	0,039
Suhu	2	11653,4	11653,4	5826,7	20,66	0,000
pH*Suhu	4	643,3	643,3	160,8	0,57	0,691
Error	9	2538,8	2538,8	282,1		
Total	17	17516,9				

S = 16,7957 R-Sq = 85,51% R-Sq(adj) = 72,62%

Uji Lanjutan Tukey

pH	N	Mean	Grouping
9,0	6	101,8	A
7,0	6	98,8	A B
4,5	6	74,6	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

Suhu	N	Mean	Grouping
55	6	126,5	A
45	6	82,3	B
30	6	66,3	B

Means that do not share a letter are significantly different.

BIODATA PENULIS



Nikita Danniswara Prasetyo, dilahirkan di Surabaya pada 30 Juli 1994. Penulis menempuh pendidikan formal tingkat dasar mulai Taman Kanak-Kanak sampai dengan SMA di kota yang sama, yaitu di TK Hang Tuah 5 Sidoarjo, SD Katolik Untung Suropati II Sidoarjo, SMP Negeri 2 Sidoarjo, dan SMA Negeri 1 Sidoarjo. Penulis diterima di Jurusan Biologi FMIPA ITS pada tahun 2012. Penulis memiliki ketertarikan dengan pelajaran Biologi sejak tingkat dasar. Kemampuannya di bidang pelajaran IPA lebih menonjol dibandingkan pelajaran lain. Selama berada di Biologi ITS, penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah di bidang Mikrobiologi. Selain itu, penulis juga aktif dalam beberapa kegiatan organisasi baik di dalam Jurusan atau di luar Jurusan. Penulis tergabung dalam Departemen DAGRI HIMABITS sebagai staff dan adminkeu. Penulis aktif dalam kegiatan tahunan INTERN FMIPA ITS sebagai Organizing Committee. Selain itu, penulis juga tergabung dalam Panitia BOF 7 dan 8. Penulis juga mengikuti beberapa pelatihan pengembangan diri LKMM pra-TD, ESQ, dan beberapa seminar nasional. Di Jurusan Biologi, penulis memiliki ketertarikan di bidang Mikrobiologi dan mengambil topik Tugas Akhir di bidang yang sama yaitu mengenai produksi enzim oleh *yeast*.

email: nikitadannisw@gmail.com