

**SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM
PROTEASE DARI LIMBAH TEBU**



**SINTA LINGEWATI
2443008039**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA
2012**

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul: **Skrining dan Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease dari Limbah Tebu** untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Unika Widya Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 20 Februari 2012



Sinta Lingewati
2443008039

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Surabaya, 20 Februari 2012



Sinta Lingewati
2443008039

**SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM
PROTEASE DARI LIMBAH TEBU**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Farmasi
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

OLEH:
SINTA LINGEWATI
2443008039

Telah disetujui pada tanggal 4 Februari 2012 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing I,



Lanny Hartanti S.Si., M.Si.
NIK. 241.00.0437

Pembimbing II,



Lisa Soegianto S.Si., Apt.
NIK. 241.07.0609

ABSTRAK

SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI LIMBAH TEBU

Sinta Lingewati
2443008039

Telah dilakukan penelitian tentang skrining dan isolasi bakteri penghasil enzim protease dari limbah tebu. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri proteolitik, mengidentifikasi isolat yang diperoleh, serta menentukan aktivitas protease ekstrak kasar enzim yang dihasilkan. Media agar susu skim digunakan untuk mengidentifikasi isolat yang memiliki aktivitas protease, dan diperoleh empat isolat proteolitik. Satu isolat dengan potensi proteolitik terbesar dipilih untuk dimurnikan lebih lanjut. Isolat proteolitik murni yang dihasilkan diidentifikasi berdasarkan hasil karakterisasi visual baik secara makroskopis, mikroskopis, dengan dan tanpa pewarnaan, serta hasil-hasil pengujian biokimia. Uji biokimia yang dilakukan mencakup uji katalase, uji nitrat, uji oksidase, uji TSIA, uji amilolitik, serta uji dengan Kit *Microbact TM : gram-negative identification system (OXOID)* sebagai pembanding uji biokimia secara konvensional dan membantu melengkapi uji biokimia yang secara konvensional lebih terbatas. Hasil menunjukkan bahwa isolat bakteri memiliki karakterisasi *Bacillus sp.*, dan didapatkan bahwa isolat bakteri proteolitik kemungkinan besar adalah *Bacillus anthracis*. Selanjutnya isolat murni dikultivasi dalam media susu skim cair pada suhu 37°C dan kecepatan aerasi 150 rpm, selama 24 dan 48 jam. Ekstrak kasar enzim protease yang diperoleh diuji aktivitasnya menggunakan metode Lowry. Aktivitas protease pada ekstrak kasar enzim hasil inkubasi 24 jam adalah $104,717 \pm 1,275$ U/ml, sedangkan aktivitas protease pada ekstrak kasar enzim hasil inkubasi 48 jam adalah $51,027 \pm 7,505$ U/ml. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1 µg protein per menit pada suhu 37°C dan pH 7,0.

Kata Kunci : protease, limbah ampas tebu, bakteri proteolitik, metode Lowry

ABSTRACT

SCREENING AND ISOLATION OF PROTEASE PRODUCING BACTERIA FROM SUGARCANE WASTE

Sinta Lingewati
2443008039

A study of screening and isolation of protease-producing bacteria sugarcane waste was conducted. The objectives of the research were to obtain proteolytic bacteria, to identify the isolate and to determine the protease activity of crude enzyme produced. Skim milk agar media was used to identify isolate with protease activity, and four proteolytic isolates were obtained. One isolate with the biggest proteolytic activity was chosen to be purified. The pure proteolytic isolate obtained was identified based on visual characterization results, either macroscopic, microscopic, with or without staining, and biochemical test result. The biochemical tests performed include catalase test, nitrate test, oxidase test, glucose fermentation test (TSIA), amylolytic test, and test using Microbact™ Kit: gram-negative identification system (Oxoid) as comparison. The results showed that the isolated bacteria had the character of *Bacillus sp* and the result of this research showed that the isolated proteolytic bacteria was most likely *Bacillus anthracis*. Then pure isolate was cultivated in liquid skim milk media at 37°C with aeration speed of 150 rpm for 24 and 48 hours. The crude extracts of protease obtained were measured its activity by Lowry method. Protease activity in crude extract of enzyme from 24 hours of incubation was $212,545 \pm 1,275$ U/ml, while protease activity in crude extract of enzyme from 48 hours of incubation was $183,115 \pm 7,505$ U/ml. One unit activity is defined as the amount of enzyme that will hydrolyze 1 µg of protein per minute at 37°C and pH 7.0.

Key words : protease, bagasse, proteolytic bacteria, Lowry method

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala karuniaNya yang berlimpah sehingga naskah skripsi yang berjudul **“SKRINING DAN ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI LIMBAH TEBU”** ini dapat diselesaikan. Naskah skripsi ini ditulis untuk memenuhi syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Dalam penulisan naskah ini penulis banyak mendapat bantuan moril maupun materil yang tak ternilai harganya. Untuk itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Papa, mama, Ko Jiang, Ko Fee, yang telah memberikan dukungan doa, moral, material, dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.
2. Lanny Hartanti, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu dan tenaga dalam memberikan bimbingan dan saran yang sangat berguna sampai terselesaikannya skripsi ini.
3. Lisa Sugianto, S.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing II yang telah menyediakan waktu dan tenaga dalam memberikan bimbingan dan saran yang berguna sampai terselesaikannya skripsi ini.
4. Yonathan Meiky Septian dan Fandy Susanto sebagai rekan skripsi yang kooperatif sampai terselesaikannya penelitian ini.
5. Sdri. Kania, Sdri. Silvi, yang sudah memberikan doa dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.

6. dr. Pikanto Wibowo selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak saran dan masukan-masukan positif yang berguna untuk skripsi ini.
7. Ibu Martha Ervina, S.Si., M.Si., Apt. selaku penguji dan selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala yang telah memberikan banyak saran dan masukan-masukan positif yang berguna untuk skripsi ini.
8. Catharina Caroline, S.Si, M.Si., Apt. selaku Sekretaris Dekan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala, yang telah menyediakan fasilitas dan pelayanan yang baik selama pengerjaan skripsi ini.
9. Dra. Dien Ariani Limyati, Henry Kurnia Setiawan, S.Si., Apt. yang telah memberikan saran yang berguna untuk skripsi ini.
10. Ibu Idajani selaku wali studi yang telah memberikan semangat, saran dan pengarahan selama penyusunan skripsi ini.
11. Seluruh dosen Fakultas Farmasi yang telah mendampingi selama proses perkuliahan mulai dari semester awal sampai akhir.
12. Seluruh staf di Laboratorium Proteomik *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya yang memberikan banyak bantuan dalam penelitian ini.
13. Pak Anto, laboran Laboratorium Mikrobiologi yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.
14. Pak Didik, laboran Laboratorium Likuid yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.
15. Pak Samsul, laboran Laboratorium Solid yang dengan ikhlas membantu dan mendukung terselesaikannya penelitian ini.
16. Mbak Mega, laboran Laboratorium Instrumen yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.

17. Bapak penjual tebu di jalan Ngagel yang dengan baik hati memperbolehkan saya untuk mengambil ampas tebu untuk menjadi sampel dalam penelitian ini dan juga memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
18. Jeni, Lenny, Messi, Cynthia, Talisa, Roy, Risky, Edwin “DEBETU”, yang memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
19. Dr. Ni'matuzaroh yang sudah membantu untuk menguji sampel bakteri dengan menggunakan Kit dan telah mendoakan skripsi ini agar berjalan lancar.
20. Teman-teman lainnya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang sudah memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.

Kiranya Tuhan memberkati kita semua dan berkenan membalas segala kebaikan dan kemurahan segenap pihak yang telah membantu penulis menyelesaikan naskah ini.

Surabaya, 19 Januari 2012

Penulis,

SINTA LINGEWATI

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| ABSTRAK | i |
| ABSTRACT | ii |
| KATA PENGANTAR | iii |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR LAMPIRAN | viii |
| DAFTAR TABEL | ix |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR SINGKATAN | xi |
| BAB | |
| 1 PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 4 |
| 1.3. Tujuan Penelitian | 5 |
| 1.4. Hipotesis..... | 5 |
| 1.5. Manfaat Penelitian | 5 |
| 2 TINJAUAN PUSTAKA..... | 6 |
| 2.1. Tinjauan tentang Enzim | 6 |
| 2.2. Tinjauan tentang Protease | 7 |
| 2.3. Tinjauan tentang Bakteri Proteolitik | 7 |
| 2.4. Tinjauan tentang Limbah Tebu | 8 |
| 2.5. Tinjauan tentang Media..... | 9 |
| 2.6. Tinjauan tentang Isolasi Mikroorganisme | 10 |
| 2.7. Tinjauan tentang Uji Biokimia | 13 |
| 2.8. Tinjauan tentang Uji Biokimia dengan Menggunakan Kit <i>Microbact</i> TM <i>Gram-negatif</i> | 14 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.9. | Tinjauan tentang Uji Aktivitas Protease | 15 |
| 2.9. | Klasifikasi Bakteri menurut <i>Bergey's Manual</i> | 15 |
| 3 | METODOLOGI PENELITIAN | 17 |
| 3.1. | Sampel, Bahan, dan Alat Penelitian | 17 |
| 3.2. | Prosedur Kerja..... | 18 |
| 3.3. | Analisis Data | 28 |
| 3.4. | Diagram Alir Kerja..... | 29 |
| 4 | HASIL PERCOBAAN DAN BAHASAN | 30 |
| 4.1. | Hasil Percobaan..... | 30 |
| 4.2. | Bahasan | 40 |
| 5 | SIMPULAN | 53 |
| 5.1. | Simpulan | 53 |
| 5.2. | Alur Penelitian Selanjutnya..... | 53 |
| | DAFTAR PUSTAKA | 55 |
| | LAMPIRAN | 58 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| A. Pembuatan Reagen | 58 |
| B. Contoh Perhitungan Aktivitas Enzim Protease | 60 |
| C. Pemilihan Panjang Gelombang | 63 |
| D. Alat Inkubasi Bakteri Disertai Pengocokan 150 rpm | 64 |
| E. Alat Sentrifugasi dengan Kecepatan 3000 rpm dan suhu 4°C..... | 65 |
| F. Karakteristik Fisiologis Spesies <i>Bacillus</i> | 66 |
| G. Pengelompokan Spesies <i>Bacillus</i> | 67 |
| H. Pembacaan Microbact Kit 12A dan 12B | 69 |
| I. Hasil Uji Fisiologis Isolat..... | 73 |
| J. Perhitungan Angka Koefisien Sebanding <i>Bacillus</i> | 74 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| 4.1. Ciri Makroskopis Keenam Koloni Terpilih | 31 |
| 4.2. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri..... | 34 |
| 4.3. Hasil Pengamatan Uji Biokimia Secara Konvensional | 37 |
| 4.4. Hasil Pengamatan Uji Biokimia dengan Menggunakan Kit | 38 |
| 4.5. Kurva Baku Albumin dengan Menggunakan Spektrofotometer ($\lambda=715$ nm)..... | 38 |
| 4.6. Aktivitas Protease Kasar Isolat Terpilih Secara Kuantitatif | 39 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 2.1. Pengenceran bertingkat..... | 12 |
| 2.2. Perbedaan <i>spread plate</i> dan <i>pour plate</i> | 13 |
| 2.3. Diagram klasifikasi bakteri Gram positif dan negatif | 16 |
| 3.1. Daerah <i>slant</i> dan <i>butt</i> pada media TSIA | 24 |
| 3.2. Diagram alir kerja | 29 |
| 4.1. Pertumbuhan isolat bakteri pada pengenceran ke- 8 sampai ke-10 | 30 |
| 4.2. Pertumbuhan enam isolat yang dipilih pada susu skim untuk dilakukan skrining..... | 31 |
| 4.3. Hasil yang diamati pada proses pemurnian koloni (a) dan (c) dengan metode penggosokan | 32 |
| 4.4. Hasil penanaman bakteri setelah beberapa kali dengan metode penuangan..... | 33 |
| 4.5. Penanaman 4 isolat terpilih pada media <i>Skim Milk Agar</i> yang memberikan penampakan secara visual yang berbeda..... | 33 |
| 4.6. Hasil pertumbuhan dari isolat murni (a3) pada media <i>Skim Milk Agar</i> yang diamati secara makroskopis..... | 34 |
| 4.7. Pewarnaan Gram dari isolat murni..... | 35 |
| 4.8. Pengecatan spora dari isolat murni..... | 35 |
| 4.9. Hasil uji biokimia secara konvensional yang menunjukkan karakterisasi dari isolat terpilih..... | 36 |
| 4.10. Hasil pengujian menggunakan Kit <i>Microbact™ : Gram-negative identification system (OXOID)</i> | 37 |
| 4.11. Kurva standar albumin | 39 |
| 4.12. Kurva pertumbuhan <i>Bacillus.sp.</i> | 52 |

DAFTAR SINGKATAN

| Singkatan | | Halaman |
|-----------|-------------------------|---------|
| λ | Panjang gelombang | 38 |
| ES | Enzim + substrat..... | 39 |
| Ket | Keterangan | 39 |
| SD | Standar Deviasi | 39 |