

PENGARUH pH MEDIUM FERMENTASI PADA PRODUKSI ENZIM
PROTEASE DARI KAPANG *Aspergillus niger* MENGGUNAKAN
SUBSTRAT AMPAS TAHU



OLEH :

MASTUTI

9203020



PERPUSTAKAAN PROF. DR. H. HASANUDDIN	
Tgl. terbit	6-4-1999.
Asal dari	FAK. MIPA
Terdapatnya	ILKATJERS.
Karya	HADIAH
No. Inventaris	99 05 1781
No. Klas	

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

UJUNG PANDANG

1997

SKRIPSI

OLEH :

MASTUTI

920320



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

UJUNG PANDANG

1997

**PENGARUH pH MEDIUM FERMENTASI PADA PRODUKSI ENZIM
PROTEASE DARI KAPANG *Aspergillus niger* MENGGUNAKAN
SUBSTRAT AMPAS TAHU**

OLEH :

MASTUTI

9203020

Skripsi untuk melengkapi tugas-tugas dan
memenuhi syarat-syarat untuk
mencapai gelar sarjana

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

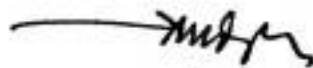
UJUNG PANDANG

1997

**PENGARUH pH MEDIUM FERMENTASI PADA PRODUKSI ENZIM
PROTEASE DARI KAPANG *Aspergillus niger* MENGGUNAKAN
SUBSTRAT AMPAS TAHU**

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



(DRS. M. NATSIR DJIDE, MS)

Nip: 130 785 083

Pembimbing Pertama



(DRS. A. ILHAM MAKHMUD, Dipl Sc.)

Nip: 130 570 874

Pembimbing Kedua



(DR. H. UMAR UBBE, MS)

Nip: 130 350 848

Pada tanggal : 26 November 1997

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penyusun panjatkan ke hadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi ini. Penyusunan skripsi ini merupakan persyaratan akademik untuk memperoleh gelar sarjana pada Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Melalui skripsi ini penyusun menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Bapak Drs. M. Natsir Djide, MS selaku Pembimbing Utama, Bapak Drs. Andi Ilham Makhmud, Dipl Sc. selaku Pembimbing Pertama dan Bapak DR. H. Umar Ubbe, MS selaku Pembimbing Kedua, atas ketulusannya dalam membimbing. Semoga Allah Yang Maha Esa membalas budi baik Bapak yang telah meluangkan waktu dan menyumbangkan pikiran serta tenaganya dalam membimbing penyusun, mulai saat perencanaan penelitian sampai selesai penyusunan skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang sama, tak lupa penyusun sampaikan kepada :

1. Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
3. Bapak DR. Tjiptasurasa, SU sebagai penasehat akademik.

4. Bapak/Ibu dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, khususnya Jurusan Farmasi yang telah mengalihkan ilmunya kepada penyusun selama menuntut ilmu dan seluruh staf dan karyawan Jurusan Farmasi atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan kepada penyusun dalam menempuh pendidikan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Dengan rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga kepada Ayahanda Sibe dan Ibunda Martini yang tercinta, kak Nasrul dan kak Marsa dan adik yang tersayang, sahabatku Andang, Fatma, Ros, Sur, Yati dan Wati serta rekan-rekan mahasiswa yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah banyak memberikan bantuan baik materiil maupun moril sehingga penyusun dapat menyelesaikan pendidikan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Akhirnya dengan segala kerendahan hati, skripsi yang sederhana ini penyusun persembahkan kepada Almamater, khususnya Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Semoga memberikan manfaat, Amin.

Ujungpandang, Oktober 1997

Penyusun

RINGKASAN

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh pH medium fermentasi pada produksi enzim protease dari kapang *Aspergillus niger* menggunakan substrat ampas tahu yang bertujuan untuk menentukan pH optimum pertumbuhan kapang *A. niger* dalam memproduksi enzim protease. Penelitian ini dilakukan dengan menginokulasikan kapang *A. niger* pada medium produksi yang telah divariasikan pHnya, yakni 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 dan 7,5. Enzim yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi dan diuji aktifitasnya berdasarkan hidrolisis enzimatis substrat kasein pada pH 3,0, suhu 37°C selama 30 menit. Aktifitas diukur dengan spektrofotometer ultra violet pada panjang gelombang 276 nm. Data hasil pengamatan diolah menggunakan rumus perhitungan aktifitas metode SAPU (Spectrophotometric Acid Protease Units), dan dianalisa secara statistik dengan metode Regresi Non Linier sehingga didapatkan pH optimum aktifitas yaitu 4,45 dengan aktifitas enzim sebesar 27,023 SAPU/g.

SUMMARY

A research on the influence of pH fermentation media to produce protease enzyme from the *Aspergillus niger* mold by using waste of Soya's kernel (Tofu) substrate has been done with the aim to conform the optimum pH needed for *A. niger* mold growth in protease enzyme production. This project was performed by inoculating *A. niger* mold in production media of various pH, namely 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 and 7.5. The enzyme produced was then separated by centrifugation, and its activity was tested based on the enzymatic hydrolytic of casein substrate at pH 3.0, with the temperature of 30°C or 30 minutes. The operation and activity measurement was done ultra violet spectrophotometry at the wavelength of 276 nm. The observation data were calculated using the SAPU (Spectrophotometric Acid Protease Units) formula method and statistical analysis using non linear regression method, with the outcome that the optimum pH activity was 4.45 and the enzyme activity was 27.023 SAPU/g.

DAFTAR ISI



Halaman

UCAPAN TERIMA KASIH	iv
RINGKASAN	vi
SUMMARY	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. POLA PENELITIAN	4
II.1 Penyiapan Alat dan Bahan	4
II.2 Penyiapan Bahan Penelitian	4
II.3 Penyiapan Mikroorganisme	4
II.4 Produktifitas enzim	4
II.4.1 Pembuatan media produksi	4
II.4.2 Penyiapan suspensi mikroba	4
II.4.3 Produksi enzim	4
II.4.4 Pemanenan enzim	4
II.5 Pengujian Aktifitas Isolat Enzim Protease	4
II.6 Pengumpulan Data	5

II.7 Analisa Data	5
II.8 Pembahasan Hasil	5
II.9 Kesimpulan	5
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	6
III.1 Uraian Mikroorganisme	6
III.1.1 Klasifikasi <i>Aspergillus niger</i>	6
III.1.2 Karakteristik <i>Aspergillus</i>	6
III.1.3 Enzim-enzim yang dihasilkan oleh <i>Aspergillus</i>	7
III.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kapang dan Pembentukan Produk	8
III.2.1 Komposisi nutrisi	8
III.2.2 Konsentrasi ion hidrogen	9
III.2.3 Suhu	9
III.3 Enzim	10
III.3.1 Enzim adalah protein	10
III.3.2 Satuan keaktifan enzim	11
III.3.3 Isolasi enzim	12
III.3.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi keaktifan enzim	13
III.3.4.1 Konsentrasi substrat	13
III.3.4.2 Konsentrasi enzim	14
III.3.4.3 Konsentrasi ion hidrogen	14

III.3.4.4 Suhu	15
III.3.5 Klasifikasi enzim	16
III.3.6 Enzim protease	17
III.4 Tahu	20
III.4.1 Klasifikasi tanaman kedelai	20
III.4.2 Uraian tanaman	20
III.4.3 Industri tahu	21
III.4.4 Ampas tahu	23
BAB IV. METODE PENELITIAN	24
IV.1 Alat Dan Bahan	24
IV.1.1 Alat-alat yang digunakan	24
IV.1.2 Bahan-bahan yang digunakan	25
IV.2 Penyiapan Bahan Penelitian	26
IV.2.1 Pengambilan bahan penelitian	26
IV.2.2 Pengolahan bahan penelitian	26
IV.3 Penyiapan Mikroorganisme	26
IV.4 Pembuatan Media Agar Miring Potato Dextrosa Agar (PDA) dan Penyiapan Biakan Mikroba	27
IV.4.1 Pembuatan media agar miring PDA	27
IV.4.2 Penyiapan biakan mikroba	28
IV.5 Produksi Enzim	28
IV.5.1 Pembuatan medium produksi	28
IV.5.2 Penyiapan suspensi mikroba	28

IV.5.3 Produksi enzim	29
IV.5.4 Isolasi enzim	29
IV.6 Pengujian Aktifitas Isolat Enzim Protease	29
IV.6.1 Larutan substrat kasein	29
IV.6.2 Larutan triklorasetat (TCA)	30
IV.6.3 Larutan sampel (isolat enzim protease)	30
IV.6.4 Pengujian aktifitas isolat enzim protease	30
IV.6.5 Pembuatan kurva standar	31
IV.7 Perhitungan Aktifitas Enzim Protease	31
IV.8 Analisa Data	32
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
V.1 Hasil Penelitian	33
V.2 Pembahasan	34
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	38
VI.1 Kesimpulan	38
VI.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
I. Pembagian Kelas Enzim Menurut IEC	17
II. Perbandingan Kandungan Gizi Kedelai, Tahu dan Ampas Tahu	23
III. Hasil Pengukuran Serapan L-tirosin Standar Pada Panjang Gelombang 276 nm	42
IV. Hasil Pengukuran Serapan L-tirosin dalam Isolat Enzim Protease Pada Panjang Gelombang 276 nm dan Perhitungan Aktifitas Enzim Protease	43

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR		Halaman
1.	Spektrum Serapan Kualitatif L-tyrosin Standar Pada Panjang Gelombang 276 nm	45
2.	Spektrum Serapan Kualitatif L-tyrosin Dalam Isolat Enzim Protease	46
3.	Kurva Baku Larutan L-tyrosin Standar Pada Panjang Gelombang 276 nm	47
4.	Kurva hubungan Antara pH dengan Aktifitas Enzim Protease (SAPU/g)	48
5.	Ampas Tahu Yang Telah Dikeringkan dan Siap Dihaluskan	49
6.	Medium Produksi Yang Telah Difermentasi Selama 3x24 jam Pada Suhu Kamar Dengan Intensitas Goyangan 170 rpm	50
7.	Isolat Enzim Protease Yang Berupa Enzim Kasar Yang Siap Diuji Aktifitasnya	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Skema Kerja	52
B. Contoh Perhitungan Aktifitas isolat Enzim Protease	53
C. Hasil Analisis Data Secara Statyistik Dari Isolat Enzim Protease Menggunakan Metode Regresi Non Linier	54
D. Hasil Pengukuran Serapan L-tirosin Standar Pada Panjang Gelombang 276 nm	55
E. Hasil pengukuran Serapan dan Konsentrasi L-tirosin Dalam Isolat Enzim Protease Pada Panjang Gelombang 276 nm	56

BAB I

PENDAHULUAN

Bioteknologi merupakan salah satu bidang ilmu pengetahuan yang telah berkembang pesat selama ini. Ilmu ini merupakan penerapan secara terpadu cabang-cabang ilmu biokimia, mikrobiologi, kimia teknik, rekayasa genetika dan biologi molekuler, untuk memperoleh suatu produk menggunakan mikroba, sel-sel atau kultur jaringan. Pemanfaatannya dalam bidang industri antara lain untuk menghasilkan penggunaan mikroba enzim (1).

Teknologi enzim dewasa ini terus berkembang di negara-negara maju, mengingat enzim merupakan produk yang mempunyai nilai ekonomi yang sangat tinggi dan diperlukan untuk menunjang berbagai industri. Sebagian besar enzim tersebut adalah kelompok hidrolase seperti selulase, amilase, protease dan lain-lain (2).

Enzim dapat diperoleh dari hewan, tanaman dan mikroorganisme, tetapi sumber enzim dari tanaman dan hewan mempunyai penanganan khusus dan lebih rumit jika dibandingkan dengan mikroorganisme (3).

Beberapa enzim komersial dari mikroba dapat diperoleh dari bakteri, kapang dan khamir. Kapang *Aspergillus niger* adalah salah satunya yang menghasilkan enzim dalam jumlah yang relatif besar, di antaranya adalah enzim protease (4).

Enzim protease dari mikroba banyak menarik perhatian. Enzim ini dalam industri makanan dan minuman digunakan sebagai pengempuk daging, penjernih bir, pembuatan roti, pembuatan adonan cracker dan dalam pembuatan keju. Dalam bidang farmasi, enzim ini digunakan untuk melancarkan pencernaan (digestive aids) dan menyembuhkan luka infeksi (4,5).

Indonesia merupakan negara agraris yang mampu menyediakan berbagai komoditi pertanian untuk beberapa industri. Kegiatan industri pengolahan hasil pertanian menghasilkan bermacam-macam limbah di samping produk utama. Salah satunya adalah limbah tahu yang berupa ampas. Selain mudah diperoleh, ampas ini masih mengandung komponen-komponen nutrisi baik organik maupun anorganik yang diperlukan oleh mikroba untuk pertumbuhannya (6,7).

Ampas ini dapat digunakan untuk memproduksi enzim dengan memanfaatkannya sebagai medium fermentasi dari mikroba penghasil enzim. Mengingat selama ini, penelitian tentang produksi enzim protease dari mikroba menggunakan substrat dedak dan tepung kedelai. Hal ini dilakukan oleh Mamesah dkk (8).

Selain komponen nutrisi, nilai pH dari medium fermentasi yang digunakan sebagai substrat penginduksi merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* dalam menghasilkan enzim protease (5,9).

Berdasarkan permasalahan tersebut maka dilakukan penelitian tentang pengaruh pH medium fermentasi terhadap pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* dalam memproduksi enzim protease menggunakan substrat ampas tahu. Penelitian ini dimaksudkan untuk memanfaatkan ampas tahu sebagai substrat penginduksi enzim protease dengan tujuan untuk menentukan pH optimum pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* dalam memproduksi enzim protease. Hasil yang diperoleh dapat digunakan untuk memanfaatkan ampas tahu sebagai substrat dalam memproduksi enzim protease sekaligus sebagai alternatif pemecahan masalah dalam penanganan ampas tahu.

BAB II

POLA PENELITIAN

II.1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan sesuai dengan kebutuhan penelitian.

II.2 Penyiapan Bahan Penelitian

Ampas tahu diambil dari Kelurahan Karang Anyar, Kecamatan Mamajang, Kotamadya Ujung Pandang dan diolah sesuai dengan kebutuhan penelitian.

II.3 Penyiapan Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah kapang *A. niger* koleksi Mikrobiologi Farmasi Laboratorium Farmaseutika, Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

II.4 Produktivitas Enzim

II.4.1 Pembuatan media produksi

II.4.2 Penyiapan suspensi mikroba

II.4.3 Produksi enzim

II.4.4 Pemanenan enzim

II.5 Pengujian Aktifitas Isolat Enzim Protease

Isolat enzim protease diuji aktifitasnya menggunakan spektrofotometer ultra violet pada panjang gelombang 276 nm.



II.6 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dikonversikan ke dalam rumus perhitungan aktifitas enzim protease.

II.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan metode regresi non linier

II.8 Pembahasan Hasil

Pembahasan berupa hasil dari data yang telah dianalisis.

II.9 Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan analisis data dan pembahasan hasil yang diperoleh.

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

III.1 Uraian Mikroorganisme

III.1.1 Klasifikasi *Aspergillus niger* (10,11)

Divisi	: Mycota
Anak divisi	: Eumycotina
Kelas	: Ascomycetes
Anak kelas	: Euascomycetidae
Bangsa	: Eurotiales
Suku	: Eurotiaceae
Marga	: <i>Aspergillus</i>
Jenis	: <i>Aspergillus niger</i>

III.1.2 Karakteristik *Aspergillus* (10,11,12) ✓

Aspergillus terdapat di mana-mana, baik di daerah kutub maupun di daerah tropik, dan hampir pada setiap substrat. Sporangya berhamburan di udara maupun di tanah dan tidak jarang tumbuh pada makanan yang dibiarkan di udara terbuka.

Beberapa jenis *Aspergillus* dapat bersifat toksik pada manusia dan hewan, tetapi banyak pula yang dapat dimanfaatkan dalam industri seperti industri alkohol, asam sitrat, asam glukonat dan beberapa asam organik lainnya serta enzim menggunakan jenis *Aspergillus niger*.

Jenis *Aspergillus niger* memiliki kepala pembawa konidia yang besar yang dipak secara padat, bulat dan berwarna hitam, coklat hitam atau ungu coklat. Konidianya besar dan mengandung pigmen. Kebanyakan galur dalam jenis ini mempunyai sklerotia yang berwarna abu-abu sampai hitam.

Perkembangbiakan *A. niger* secara aseksual dengan fase pertumbuhan yang tidak sempurna. Pembentukan konidia dimulai dari hifa yang tumbuh menegak. Pada pangkalnya terdapat sel kaki yang suatu saat akan menggebung menjadi vesikel. Pada permukaan vesikel ini tumbuh tubuh-tubuh serupa botol yang ujungnya menghasilkan konidia. Pembentukan konidia dimulai dari yang ujung, dimana sel penghasil konidia disebut sterigma sedangkan bagian hifa sampai sel kaki disebut konidiofor.

III.1.3 Enzim-enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus* (1,11)

Beberapa jenis *Aspergillus* yang merupakan penghasil enzim antara lain :

1. *Aspergillus niger*

Menghasilkan enzim amilase, glukoamilase, selulase, hemiselulase, pektinase, protease, katalase.

2. *Aspergillus oryzae*

Menghasilkan enzim amilase, protease, ribonuklease, pektinase.

3. *Aspergillus terreus*

Menghasilkan enzim selulase.

III.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kapang dan Pembentukan Produk (8,9,13,14)

Kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh dan membentuk enzim dipengaruhi oleh komposisi nutrien, pH dan suhu medium fermentasi.

III.2.1 Komposisi nutrien

Karbon merupakan unsur terpenting yang dibutuhkan bagi pertumbuhan. Kapang memerlukan karbon dengan dua tujuan utama yaitu sebagai bahan pembentuk sel dan sebagai sumber energi.

Senyawa nitrogen (protein) merupakan senyawa pembentuk protoplasma dan dinding sel. Jenis sumber nitrogen juga mempengaruhi produktifitas enzim. Selama fase pertumbuhan, kapang menggunakan senyawa nitrogen dengan cepat dan pada periode ini enzim mulai terdapat pada media.

Selain karbon dan nitrogen, kapang juga membutuhkan mineral untuk pertumbuhannya. Garam-garam magnesium dan kalsium diperlukan sebagai nutrisi juga sering digunakan untuk mengendapkan senyawa kimia pengganggu. Sedangkan lithium, natrium, kalium dan rubidium dapat merangsang pembentukan spora pada konsentrasi tertentu.

III.2.2 Konsentrasi ion hidrogen (pH)

pH medium adalah salah satu parameter yang dapat mempengaruhi pertumbuhan kapang dan pembentukan enzim selama fermentasi. Kebanyakan kapang dapat tumbuh pada kisaran pH yang luas, yaitu pH 2-8,5, tetapi biasanya pertumbuhannya akan lebih baik pada kondisi asam atau pH rendah. Batas pH untuk pertumbuhan kapang merupakan gambaran dari batas pH bagi kegiatan enzim.

Selama pertumbuhan kapang seringkali terjadi perubahan pH media. Kapang yang melaksanakan proses fermentasi menghasilkan asam sehingga pH dapat turun dan sewaktu metabolisme protein dan asam amino dilepaskan ion amonium sehingga pH media menjadi basa.

Perubahan pH terjadi dengan cepat dalam lingkungan tertutup sehingga menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Untuk mencegah hal ini seringkali ditambahkan larutan penyangga dalam media. Perlu atau tidaknya suatu medium diberi larutan penyangga tergantung kepada maksud penggunaannya dan dibatasi oleh kapasitas menyangga yang dimiliki senyawa-senyawa yang digunakan.

III.2.3 Suhu

Pertumbuhan mikroba dan sintesis enzim yang dapat diproduksi oleh mikroba dipengaruhi oleh suhu. Suhu yang

terlalu tinggi dapat mengakibatkan proses pengendapan protein yang menyebabkan kematian sel sedangkan suhu yang terlalu rendah akan mengurangi aktifitas enzim sehingga pertumbuhan mikroorganisme terganggu. Suhu optimal biasanya suhu dimana aktifitas metabolisme berjalan dengan baik, akan tetapi hal ini berbeda untuk setiap jenis mikroba dan jenis enzim yang dihasilkannya. Untuk pembentukan enzim ekstraselluler akan lebih baik pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimal pertumbuhan mikroba.

Kebanyakan kapang bersifat mesofilik yaitu tumbuh baik pada suhu kamar. Suhu optimal pertumbuhan untuk kebanyakan kapang adalah sekitar 25-30°C, tetapi beberapa dapat tumbuh pada suhu 35-37°C atau lebih tinggi misalnya *Aspergillus*.

III.3 Enzim

III.3.1 Enzim adalah protein (13,15,16)

Enzim adalah katalis organik yang banyak terdapat dalam sel hidup yang mempunyai fungsi penting untuk reaksi biokimia yang secara bersamaan membentuk metabolisme perantara dari sel dalam makhluk hidup. Umumnya zat yang bersifat sebagai katalis hanya mempercepat reaksi kimia, walaupun ikut dalam reaksi serta mengalami perubahan fisis

selama reaksi, tetapi kembali ke keadaan semula jika reaksi selesai.

Kebanyakan enzim adalah protein sederhana, biasanya terdiri dari pro enzim yang tidak aktif atau simogen dan apoenzim. Enzim umumnya membutuhkan molekul lain sebagai kofaktor untuk memperoleh keaktifan yang sempurna. Kofaktor atau koenzim ini dapat berupa unsur anorganik atau molekul organik. Sedangkan apoenzim adalah bagian proteinnya. Bila koenzim dan apoenzim ini bergabung, kedua bagian tersebut membentuk enzim yang lengkap, disebut holoenzim.

III.3.2 Satuan keaktifan enzim (16,17)

Enzim merupakan katalis sehingga perubahan substrat oleh enzim tergantung pada berbagai faktor yang mempengaruhi laju reaksi enzim. Oleh karena itu penting untuk membuat batasan mengenai aktifitas atau konsentrasi enzim. Satuan konsentrasi molar tidak selalu sesuai bagi enzim, karena bobot molekul protein yang bersangkutan kemungkinan tidak dikenal.

Commission on Enzymes of The International Union of Biochemistry (CEIUB) menetapkan satuan enzim yaitu :

a. Satu satuan aktifitas

Banyaknya enzim yang menyebabkan perubahan $1,0 \times 10^{-6}$ mol substrat per menit pada 25°C pada keadaan optimal.

b. Aktifitas spesifik

Jumlah satuan /mg protein

c. Bilangan peredaran

Jumlah molekul substrat yang dikerjakan per satuan waktu dan per pusat aktif.

III.3.3 Isolasi Enzim (1,18)

Tujuan utama isolasi adalah untuk memisahkan bagian yang padat terdiri dari partikel-partikel yang tidak larut dan sel mikroba dengan cara penyaringan (filtrasi) atau sentrifugasi.

Penyaringan merupakan cara yang umum digunakan untuk berbagai skala, tetapi kekurangannya dibandingkan dengan sentrifugasi adalah waktu yang diperlukan lebih lama, sulit dikontrol dan endapan protein harus dipisahkan dari media penyaringan.

Metode sentrifugasi dilakukan jika penyaringan tidak memuaskan. Sentrifugasi diperlukan jika diinginkan produk dengan tingkat kebersihan yang tinggi.

Enzim yang didapatkan dari proses ini masih berupa enzim kasar. Untuk mendapatkan enzim murni harus dilakukan proses pengerjaan lebih lanjut.

III.3.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi keaktifan enzim

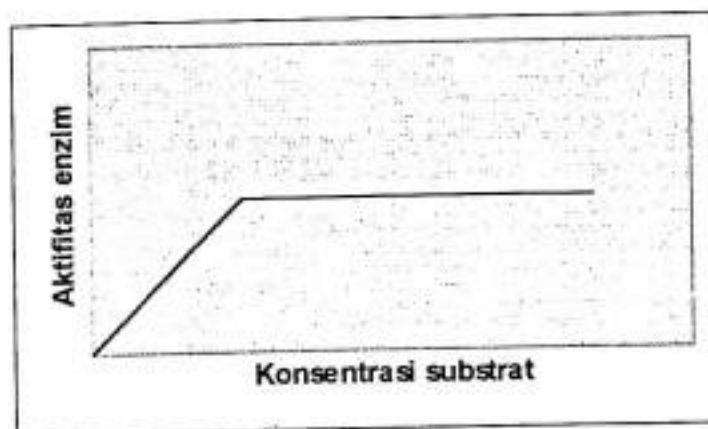
(13,15,16,17)

III.3.4.1 Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, penambahan substrat yang berturut-turut sampai jumlah tertentu pada jumlah enzim yang tetap akan mempercepat reaksi enzimatik.

Dari gambar berikut terlihat bahwa aktifitas enzim mula-mula meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Akan tetapi setelah konsentrasi substrat dinaikkan lebih lanjut akan tercapai suatu aktifitas yang maksimum. Suatu penambahan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak mempunyai akibat terhadap aktifitas enzim. Gejala ini disebut kinetika penjumlahan.

Gambar di bawah ini memperlihatkan hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktifitas enzim :

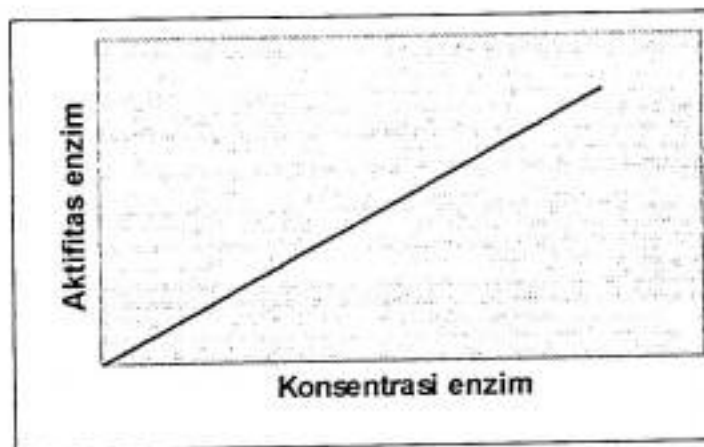




III.3.4.2 Konsentrasi enzim

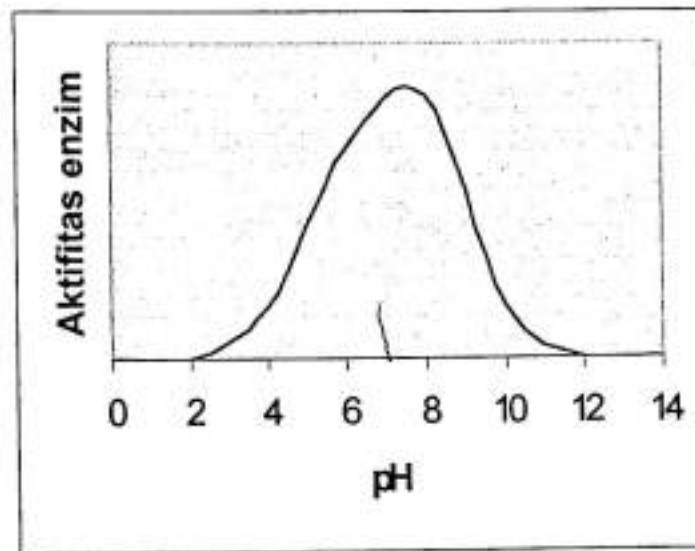
Konsentrasi enzim berguna untuk mengetahui banyaknya enzim yang mengkatalis substrat. Pada konsentrasi enzim yang kecil aktifitas enzim akan rendah, tetapi akan meningkat secara linear dengan bertambahnya konsentrasi enzim.

Gambar berikut memperlihatkan hubungan antara konsentrasi enzim dengan aktifitas enzim :



III.3.4.3 Konsentrasi ion hidrogen (pH)

Pengaruh pH terhadap suatu reaksi enzim menjadi rumit oleh beberapa faktor, yang dapat saling bersaing. Jadi kemungkinan dapat terlihat gambar sebagai berikut :



Jika banyak enzim ternyata paling aktif pada sekitar pH 7, maka beberapa enzim adalah maksimum aktif pada pH tinggi atau pH rendah, tergantung pada keadaan bekerjanya enzim.

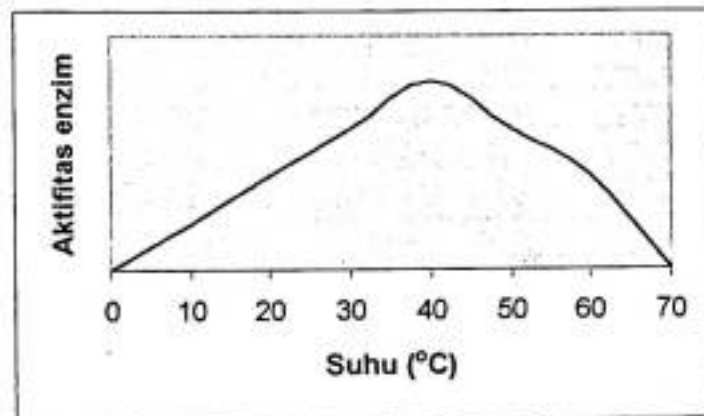
III.3.4.4 Suhu

Kenaikan suhu sampai optimum akan diikuti pula oleh kenaikan aktifitas enzim, dan akhirnya enzim kehilangan semua aktifitas jika protein menjadi rusak akibat panas. Kepekaan enzim terhadap suhu pada keadaan yang melebihi suhu optimum disebabkan karena perubahan fisika kimia protein penyusun enzim.

Kebanyakan enzim mengalami kerusakan (denaturasi) pada suhu 50-80°C. Banyak enzim

berfungsi optimal dalam batas-batas suhu antara 25-37°C.

Gambar di bawah ini menunjukkan hubungan antara suhu dengan aktifitas enzim :



III.3.5 Klasifikasi enzim (4,16,17)

Pada mulanya enzim dikelompokkan berdasarkan reaksi yang dikatalisisnya. Berdasarkan peraturan dari Komisi Enzim International atau sistem IEC, yang telah diterima oleh sistem International Union of Biochemistry, dimana dalam sistem IEC tiap enzim mempunyai nama sistematik yang sangat bersifat menguraikan.

Terdapat enam kelas utama enzim yang dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel I : Pembagian kelas enzim menurut IEC

No.	Kelas	Reaksi Yang Dikatalisis
1.	Oksidoreduktase	Pemindahan elektron
2.	Transferase	Pemindahan gugus fungsional
3.	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4.	Liase	Penambahan gugus ke ikatan atau sebaliknya
5.	Isomerase	Pemindahan gugus ke dalam molekul menghasilkan isomer
6.	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C=O dan C-N oleh reaksi kondensasi

III.3.6 Enzim Protease (1,4,5)

Enzim protease atau proteolitik mempunyai dua pengertian, yaitu proteinase yang mengkatalisis hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen besar, dan peptidase yang menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Enzim protease yang berasal dari mikroorganisme adalah protease yang mengandung proteinase dan peptidase. Proteinase

biasanya akan dikeluarkan oleh mikroorganisme pada media fermentasi selama pertumbuhannya sedangkan peptidase didapat hanya bila sel mengalami autolisis.

Berdasarkan reaksi yang dikatalisis, enzim pemecah protein dapat dikelompokkan dalam kelas ketiga yaitu hidrolase dan sub kelas empat yaitu peptidase.

Klasifikasi enzim pemecah protein yang sering dipakai ada dua, yaitu :

a. Bergman dan Futon (1941)

Mengklasifikasikan enzim berdasarkan posisi ikatan peptida yang dipecahkan oleh enzim tersebut dalam dua golongan, yaitu :

1. Enzim eksopeptidase yang dapat dibagi lagi menjadi karboksi (ekso) peptidase dan amino (ekso) peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan gugus amino terminal.
2. Enzim endopeptidase, yaitu kelompok enzim yang memecah ikatan peptida dari senyawa protein.

b. Hartley (1960)

Mengklasifikasikan enzim berdasarkan reaksi kimia dari lokasi aktif pada enzim tersebut, yaitu :

1. Enzim protease serin

Mempunyai residu serin pada lokasi aktifnya. Kelompok enzim golongan ini adalah tripsin, kimotripsin, elastase dan subtilin.

2. Enzim protease sulfhidril

Mempunyai residu sulfhidril pada lokasi aktifnya, dan jenis enzim ini dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat. Kelompok enzim golongan ini adalah protease dari tanaman dan mikroba misalnya papain, fisin dan bromelin.

3. Enzim protease metal (logam)

Enzim yang keaktifannya tergantung pada adanya logam. Jika logam terikat kuat disebut metalloenzim, tetapi jika ikatannya lemah maka logam itu berfungsi sebagai aktifator. Dalam hal ini logam dapat berupa mineral seperti Mg, Zn, Co, Fe dan sebagainya. Jenis enzim ini dapat dihambat oleh EDTA yang mengkhelat logam sehingga keaktifannya dapat berkurang atau hilang sama sekali.

4. Enzim protease asam

Enzim yang pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil dan mempunyai keaktifan yang tinggi dalam suasana asam. Keaktifan enzim ini dapat dihambat oleh senyawa p-bromofenasil bromida. Enzim yang termasuk

dalam golongan ini adalah papain, renin dan protease kapang.

III.4 Tahu

III.4.1 Klasifikasi tanaman kedelai (19,20)

Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Fabales
Suku	: Leguminosae
Anak suku	: Papilionaceae
Marga	: Glycine
Jenis	: <i>Glycine max</i> Merr.

III.4.2 Uraian tanaman (19,21)

Tanaman kedelai (*Glycine max* Merr.) termasuk famili Leguminosae, dapat tumbuh pada berbagai jenis tanah, hanya pada tanah yang banyak mengandung pasir kwarsa pertumbuhannya kurang baik kecuali bila diberikan pupuk organik atau kompos dalam jumlah yang cukup banyak.

Tanaman ini tumbuh di musim panas, tinggi 180 cm dan bercabang ke seluruh anak, mempunyai tiga daun pada tiap tangkai. Buahnya berwarna coklat dan berbulu-bulu, tumbuhnya kurang lebih 7,62 cm dari suatu tangkai yang pendek dan mempunyai 2-4 biji yang berwarna coklat atau hijau. Bunganya

kecil berwarna putih atau ungu dan warna bijinya bermacam-macam, yaitu putih dan hitam.

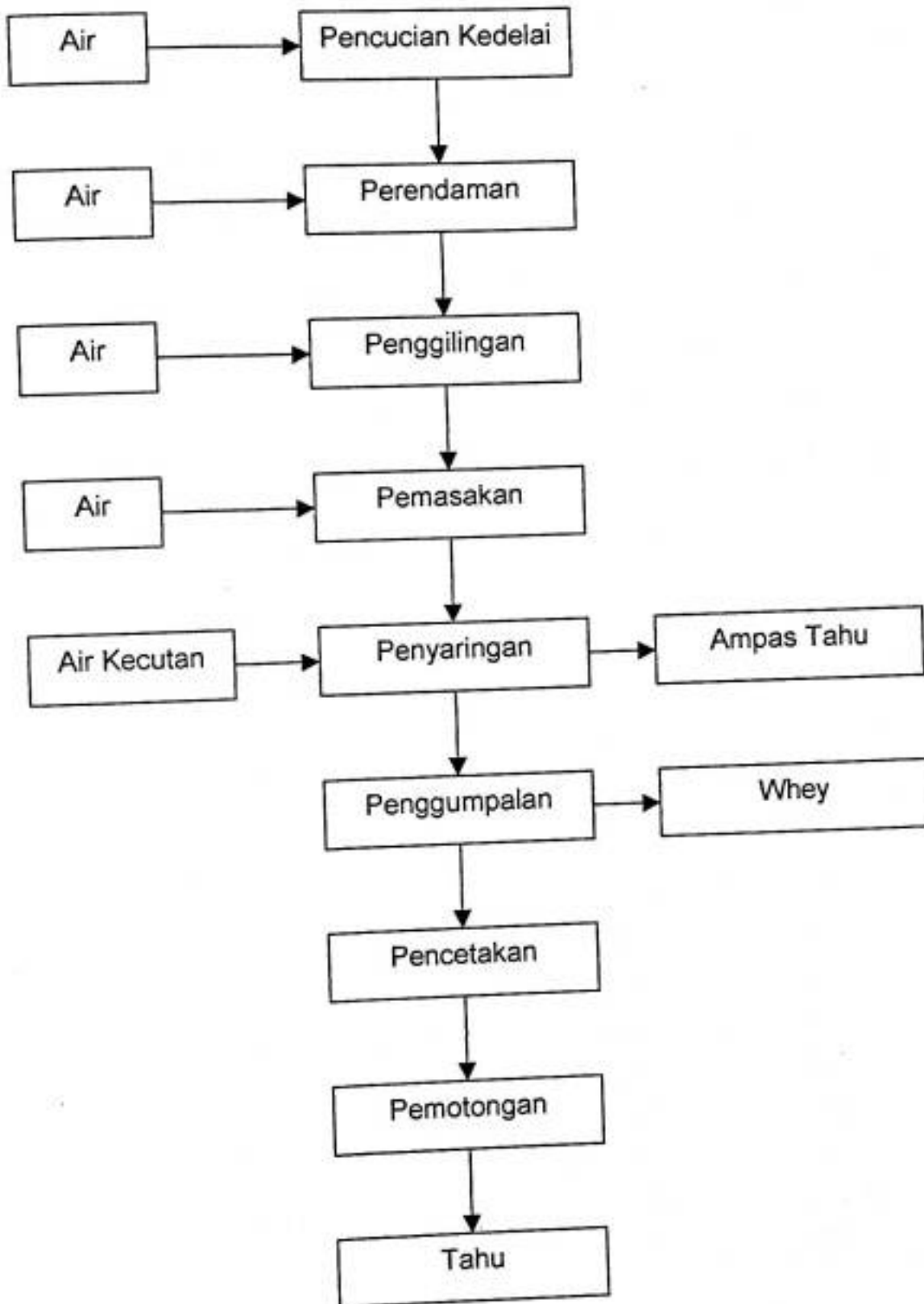
III.4.3 Industri tahu (6,7,17)

Tahu merupakan jenis makanan yang digemari oleh hampir segala lapisan masyarakat karena selain murah juga bergizi tinggi. Industri tahu merupakan salah satu industri rumah tangga yang terkenal sejak lama, yang berasal dari Cina.

Ditinjau dari segi kesehatan, tahu merupakan makanan yang sangat menyehatkan dan mengandung zat-zat yang diperlukan oleh tubuh. Tiap 100 g tahu mengandung 7,8 g protein, 4,6 g lemak, 1,6 g karbohidrat dan mineral serta vitamin.

Pembuatan tahu masih menggunakan alat yang sederhana. Akibatnya dalam pengolahannya masih banyak protein yang hilang bersama limbah cair atau tertinggal dalam ampas karena cara ekstraksi maupun penggumpalan protein yang kurang sempurna. Untuk penggumpalan yang sering digunakan adalah asam cuka (CH_3COOH).

Skema Pembuatan Tahu (6)



III.4.4 Ampas tahu (6,7,17)

Ampas tahu dihasilkan pada saat pembuatan tahu berlangsung dengan hasil limbah lainnya berupa cairan tahu (whey). Ampas tahu ini sudah dimanfaatkan untuk makanan ternak dan bahan pembuatan tempe gembus, sedangkan limbah cair umumnya langsung dibuang ke lingkungan. Namun sekarang banyak dijual sebagai air tahu yang bergizi tinggi.

Dari daftar komposisi makanan Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI, diperoleh perbandingan kandungan gizi antara kedelai, tahu dan ampas tahu. Dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel II. Perbandingan kandungan gizi kedelai, tahu dan ampas tahu

Komposisi	Bahan / 100 g		
	Kedelai	Tahu	Ampas Tahu
Kalori (mg)	331	68	414
Protein (g)	34,9	7,8	26,6
Lemak (g)	18,1	4,6	18,3
Karbohidrat (g)	34,8	1,6	41,3
Kalsium (mg)	227	124	19
Fosfor (mg)	587	63	29
Besi (mg)	8,0	0,8	(4,0)
Vitamin A (SI)	1,0	(0)	0
Vitamin B1 (mg)	1,07	(0,06)	(0,20)
Air	3,5	84,8	9,0

BAB IV
METODE PENELITIAN

IV.1 Alat dan Bahan

IV.1.1 Alat-alat yang digunakan

- | | | |
|----|------------------|---------------------|
| 1 | Spektrofotometer | (Hewlett Packard) |
| 2 | Sentrifugasi | (Soos) |
| 3 | Shaker | (Orbit) |
| 4 | Otoklaf | (Portable) |
| 5 | Oven | (Electrolux) |
| 6 | Hemositometer | (Improved Neubeaur) |
| 7 | Inkubator | (Memmert) |
| 8 | Laminar Air Flow | (Eachi) |
| 9 | Lemari pendingin | (Samsung) |
| 10 | Mikroskop | |
| 11 | Neraca | (Ohaus) |
| 12 | Jarum inokulasi | |
| 13 | Karet penghisap | (Assistent) |
| 14 | Labu takar | (Fortuna) |
| 15 | Lampu spiritus | |
| 16 | Erlenmeyer | (Pyrex) |
| 17 | Gelas kimia | (Pyrex) |
| 18 | Gelas ukur | |

19. pH meter (Hanna)
20. Pipet volume
21. Pipet tetes
22. Rak tabung
23. Ayakan no. 40
24. Batang pengaduk
25. Corong
26. Sendok tanduk
27. Tangas air
28. Timbangan analitik (Sartorius)
29. Tabung reaksi

IV.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

1. Air suling
2. Ampas tahu
3. Biakan murni *Aspergillus niger*
4. Medium Potato Dextrosa Agar (PDA)
5. L-tirosin p.a.
6. Asam tartrat
7. Asam asetat glasial
8. Kasein grade Hammerstein
9. Glisin
10. Kalium klorida
11. Kalsium klorida

- 12 Kalium dihidrogen fosfat
- 13 Natrium klorida
- 14 Natrium dihidrogen fosfat
- 15 Natrium hidroksida
- 16 Natrium asetat trihidroksil
17. Magnesium klorida
- 18 Asam klorida
- 19 Asam triklorasetat
- 20 Aluminium foil
- 21 Kapas
- 22 Kertas saring

IV.2 Penyiapan Bahan Penelitian

IV.2.1 Pengambilan bahan penelitian

Ampas tahu diambil dari Kelurahan Karang Anyar, Kecamatan Mamajang, Kotamadya Ujung Pandang.

IV.2.2 Pengolahan bahan penelitian (22)

Substrat berupa ampas tahu dikeringkan di bawah sinar matahari lalu ditumbuk dalam lumpang, dan diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40.

IV.3 Penyiapan Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah kapang *Aspergillus niger* koleksi Mikrobiologi Farmasi laboratorium Farmaseutika, Jurusan

Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

IV.4 Pembuatan Media Agar Miring Potato Dextrosa Agar (PDA) dan Penyiapan Biakan Mikroba

IV.4.1 Pembuatan media agar miring PDA (23)

Komposisi medium PDA :

Infus kentang	4 g
Dekstrosa	20 g
Agar	15 g
Asam tartrat 10%	19 ml
Air suling sampai	1000 ml

Cara pembuatan :

Untuk 1000 ml ditimbang media PDA sebanyak 39 g. Dibuat 200 ml, maka ditimbang sebanyak 7,8 g. Kemudian ditambahkan air suling sebanyak 180 ml dan dipanaskan sampai mendidih. Didinginkan sampai suhu 40°C lalu dicukupkan dengan air suling sampai 200 ml dan selanjutnya disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm. Setelah itu ditambahkan 3,8 ml asam tartrat 10%, dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 5 ml untuk setiap tabung. Selanjutnya tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dalam keadaan masih panas, tabung reaksi diletakkan dalam posisi miring dan dibiarkan membeku.

IV.4.2 Penyiapan biakan mikroba (24)

Sejumlah biakan murni *A. niger* dengan menggunakan jarum inokulasi steril, diinokulasikan pada media agar miring PDA lalu diinkubasikan pada suhu kamar selama 3 x 24 jam.

IV.5 Produksi Enzim

IV.5.1 Pembuatan medium produksi (22)

Substrat berupa ampas tahu yang telah diayak diambil sebanyak 6%, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan mineral $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, KCl 0,02%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02% dan NaCl 0,3%.

Medium produksi ini dibuat dalam 5 tempat yang masing-masing media ditambahkan larutan dapar fosfat 100 ml dengan pH 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 dan 7,5. Media ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm, lalu didinginkan sampai suhu kamar sambil inokulum disiapkan.

IV.5.2 Penyiapan suspensi mikroba (14,23)

Suspensi mikroba disiapkan dengan memasukkan air suling steril ke dalam media agar miring dan permukaan agar yang ditumbuhi spora dari kapang *A. niger* digosok perlahan-lahan dengan jarum inokulasi steril. Kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi air suling steril sebanyak 20 ml lalu



IV.6.2 Larutan triklorasetat (TCA)

Ditimbang 9,0 g TCA dan 9,5 g natrium asetat trihidroksil dilarutkan dalam 300 ml air suling. Ditambahkan 10 ml asam asetat glasial dan diaduk hingga homogen. Larutan ini dipindahkan ke dalam labu takar 500 ml dan diencerkan dengan air suling sampai tanda tera dan dikocok.

IV.6.3 Larutan sampel (isolat enzim protease)

Diambil sebanyak 2 ml isolat enzim protease, lalu ditimbang secara teliti. Larutan sampel ini siap untuk diuji aktifitasnya.

IV.6.4 Pengujian aktifitas isolat enzim protease

Disiapkan 6 buah tabung, masing-masing 1 tabung untuk blanko dan 5 tabung untuk sampel. Masing-masing tabung diisi dengan larutan substrat kasein sebanyak 10 ml dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya tabung untuk sampel ditambahkan 2,0 ml isolat enzim protease sedangkan tabung untuk blanko tidak ditambahkan sampel.

Setiap tabung ditutup rapat-rapat dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Jika tepat 30 menit, maka ditambahkan larutan TCA 10 ml pada setiap tabung dan dikocok selama 40 detik dengan kuat. Setiap tabung kembali diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Jika waktu

inkubasi telah berakhir, setiap tabung didinginkan dalam wadah yang berisi es selama 5 menit, kemudian disaring hingga jernih.

Filtrat yang diperoleh ditentukan serapannya dengan spektrofotometer ultra violet dengan panjang gelombang 276 nm.

IV.6.5 Pembuatan kurva standar

Ditimbang teliti 100,0 mg L-tirosin dan dimasukkan ke dalam labu takar 1000 ml, dilarutkan dengan 60 ml HCl 0,1 N. Setelah larut sempurna, diencerkan dengan air suling sampai tanda tera dan dikocok baik-baik. Dari larutan ini dibuat larutan dengan konsentrasi 20, 40, 60 dan 80 bpj dengan pengenceran. Keempat larutan ini ditentukan serapannya pada panjang gelombang 276 nm menggunakan spektrofotometer ultra violet dengan larutan HCl 0,006 N sebagai blanko. Serapan larutan tersebut diplot terhadap konsentrasi L-tirosin dan ditentukan regresinya dalam persamaan garis lurus.

IV.7 Perhitungan Aktifitas Enzim Protease (25)

Aktifitas enzim protease dalam sediaan sampel dapat dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\text{Aktifitas (SAPU/g)} = (A - I) \times 22/s \times 30 \times W$$

Keterangan :

A = Serapan sampel

I = Nilai intersep

22 = Volume total pengujian akhir (ml)

s = Nilai slope

30 = Waktu inkubasi (menit)

W = Berat sampel (g)

IV.8 Analisa Data (27)

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan Metode Regresi Non Linier .

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1 Hasil Penelitian

Dengan metode yang telah diuraikan pada bab IV bagian 5 diperoleh isolat enzim protease yang masih berupa enzim kasar.

Hasil penentuan pH optimum untuk pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* dalam memproduksi enzim protease didasarkan atas aktifitas enzim ini. Pengukurannya dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer ultra violet dengan panjang gelombang 276 nm.

Dari analisis statistik menggunakan metode regresi non linier diperoleh pH optimum pertumbuhan kapang *A. niger* dalam memproduksi enzim protease adalah pH 4,45 dengan aktifitas enzim sebesar 27,023 SAPU/g. (dapat dilihat pada lampiran C).

V.2 Pembahasan

Aktifitas isolat enzim protease didasarkan atas banyaknya produk yang dihasilkan oleh enzim ini setelah bereaksi dengan substrat yaitu kasein. Produk yang dihasilkan adalah L-tirosin. Semakin banyak L-tirosin yang dihasilkan maka semakin tinggi keaktifan dari enzim protease ini. Menurut Anna, Darwis dan Sukara (17,25), L-tirosin merupakan asam amino yang banyak terdapat dalam kasein, sehingga

L-tirosin yang dijadikan sebagai standar dalam menentukan aktifitas enzim protease dengan kasein sebagai substrat.

Hasil analisis secara kualitatif menunjukkan adanya L-tirosin dalam isolat enzim protease ini. Hal ini dapat dilihat dari spektrum serapan isolat enzim protease, dimana pada panjang gelombang 276 nm memperlihatkan adanya serapan (dapat dilihat pada gambar 1 dan 2).

Berdasarkan hasil perhitungan, aktifitas enzim protease mencapai maksimum pada nilai pH 4,45 yaitu sebesar 27,023 SAPU/g atau konsentrasi 57,52560 bpj. Ini berarti bahwa pada nilai pH 4,45 kapang *A. niger* paling baik pertumbuhannya dalam memproduksi enzim protease. Hasil yang diperoleh ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Mamesah dkk, dimana pH yang paling baik untuk pertumbuhan kapang *A. niger* adalah pada pH 6,5 dengan konsentrasi 14,8575 bpj. Meskipun demikian, baik pH 4,5 maupun 6,5 masih sesuai dengan yang terdapat pada pustaka (5,9,13), dimana dinyatakan bahwa nilai pH optimum untuk pertumbuhan kapang *A. niger* sekitar pH 3,8-7,0.

Hasil yang berbeda disebabkan karena pada penelitian Mamesah dkk, substrat yang digunakan sebagai penginduksi enzim protease adalah dedak dan tepung kedelai yang ditambahkan KH_2PO_4

sebagai suplemen. Sedangkan pada penelitian ini yang digunakan sebagai substrat adalah ampas tahu. Ampas ini merupakan sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan kapang, dimana jumlah karbohidrat dan protein yang dikandungnya berturut-turut adalah 41,3% dan 26,6%. Tepung kedelai sendiri mengandung sebanyak 29,9% dan 35,9% karbohidrat dan protein. Walaupun jumlah protein yang dikandung oleh ampas tahu lebih rendah dibanding tepung kedelai, substrat yang digunakan masih ditunjang oleh mineral-mineral ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, KCl 0,02%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02% dan NaCl 0,3%) yang dibutuhkan oleh kapang untuk pertumbuhannya. Menurut Darwis dan Sukara (25), komposisi nutrisi yang digunakan mempengaruhi kapang untuk tumbuh dan membentuk enzim.

Selain itu, perbedaan jenis fermentasi yang digunakan juga mempengaruhi perbedaan hasil yang diperoleh. Pada penelitian Mamesah dkk, jenis fermentasi yang digunakan adalah media padat, dimana salah satu kelemahan dari media padat adalah timbulnya masalah panas jika digunakan substrat lembab dalam jumlah besar. Hal ini dapat mempengaruhi pertumbuhan kapang *A. niger* dalam memproduksi enzim protease. Sedangkan pada fermentasi cair yang digunakan dalam penelitian ini, menggunakan penangas bergoyang

(shaker) sehingga dapat menaikkan kecepatan kelarutan oksigen, melancarkan sirkulasi dan mengakibatkan turbulensi yang mempercepat transfer nutrisi dan oksigen ke dalam sel. Jenis fermentasi atau kondisi kultur yang digunakan dalam memproduksi enzim, menurut Muchtadi (1) mempengaruhi kecepatan produksi enzim dari mikroba.

Jika ditinjau dari segi pertumbuhan mikroorganisme, pH media sewaktu pertumbuhan akan mempengaruhi protein (enzim dan sistem transport) yang terdapat pada membran sel. Struktur protein akan berubah bila nilai pH media berubah karena mikroorganisme memiliki enzim yang berfungsi sempurna pada pH tertentu. Dalam hal ini, enzim protease yang dihasilkan oleh *A. niger* berfungsi optimum pada nilai pH 4,45. Bila terjadi penyimpangan (di bawah dan di atas pH 4,45), pertumbuhan dan metabolisme *A. niger* kurang baik bahkan dapat terhenti. Hal ini sesuai dengan yang terdapat pada pustaka (10,14), yang menyatakan bahwa enzim merupakan bagian dari sel sehingga semua faktor yang mempengaruhi sel juga akan mempengaruhi kegiatan enzim.

Dari gambar 4, terlihat bahwa aktifitas enzim protease meningkat sesuai dengan bertambahnya nilai pH dan mencapai maksimum pada nilai pH 4,45 dan kemudian mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh hal yang telah diuraikan tadi, juga karena pada nilai pH di bawah dan di atas nilai pH optimum, gugus fungsional esensial

pada sisi aktif enzim tidak mengalami keseimbangan ionisasi, sehingga terjadi perubahan struktur konformasi protein enzim. Menurut Lehninger (16), pada kondisi tersebut terjadi denaturasi pada protein enzim sehingga kemampuan aktifitas enzim tidak maksimum.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemanfaatan ampas tahu sebagai substrat penginduksi enzim protease adalah cukup efektif, sehingga dapat dijadikan bahan pertimbangan sebagai substrat alternatif dalam memproduksi enzim protease.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Nilai pH optimum pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* dalam memproduksi enzim protease adalah pada pH 4,45 dengan aktifitas enzim sebesar 27,023 SAPU/g.
2. Pemanfaatan ampas tahu untuk produksi enzim protease memberikan hasil yang baik sehingga dapat dijadikan substrat alternatif penginduksi enzim protease.

VI.2 Saran

Enzim protease yang diperoleh dari hasil penelitian ini masih berupa enzim kasar. Untuk itu perlu dilakukan proses pemurnian lebih lanjut.



DAFTAR PUSTAKA

1. Muchtadi, D., Palupi, N.S., dan Astawan, M. (1992), "Enzim Dalam Industri Pangan", Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, DITJEN DIKTI, PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor, 3, 36, 80.
2. Said, E.G. (1987), "Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi", Edisi I, PT. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta, 146-158.
3. Suwahyono, U., dan Zey, A. (1991), "Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri Bacillus BPPT CC.01", Maj. BPPT, No. XLI, Jakarta, 94-95.
4. Winarno, F.G. (1995), "Enzim Pangan", PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 52-53, 77-78.
5. Ward, O.P. (1983), "Proteinases in Microbial Enzymes and Biotechnology", William M.F. (Ed.), Applied Science Publishers, London, 263-305.
6. Kastyanto, F.L.W. (1992), "Membuat Tahu", Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta, 7-8.
7. Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI. (1981), "Daftar Komposisi Bahan Makanan", Penerbit Bhratara Karya Aksara, Jakarta, 21-23.
8. Mamesah, J.A.B., dkk. (1993), "Produksi, Isolasi dan Pemurnian Enzim Protease dari *Aspergillus niger*", Kursus Singkat Bioteknologi Angkatan II, Fakultas MIPA bekerjasama dengan Proyek BP3T DITJEN DIKTI, Ujung Pandang, 6-8.

9. Carlile, M.J., dan Watkinson, S. (1995), "The Fungi", Academic Press Harbourt Brace and Company Publishers, London, 122-131, 135-136.
10. Suriawiria, U. (1985), "Pengantar Mikrobiologi Umum", Penerbit Angkasa, Bandung, 127, 129, 197-199.
11. Dwidjoseputro, D. (1978), "Pengantar Mikologi", Penerbit Alumni, Bandung, 147-152, 285-294.
12. Fardiaz, S. (1992), "Mikrobiologi Pangan 1", PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 204-205.
13. Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. (1986), "Dasar-Dasar Mikrobiologi", Terjemahan oleh Ratna S.H., Teja I., S. Sutarmi T. dan Sri Lestari A., Penerbit UI Press, Jakarta, 317-327.
14. Lay, B.W. (1994), "Analisis Mikroba di Laboratorium", PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta, 55-59.
15. Sultanry, R., dan Kaseger, B. (1985), "Kimia pangan", Badan Kerjasama PTN INTIM, Ujung Pandang, 93-97.
16. Lehninger, A.L. (1988), "Dasar-Dasar Biokimia", Jilid I, Terjemahan oleh M. Thenawijaya, Penerbit Erlangga, Jakarta, 240-242, 247-248.
17. Poedjiadi, A. (1994), "Dasar-Dasar Biokimia", Penerbit UI Press, Jakarta, 140-163.
18. Ansori, R. (1992), "Teknologi Fermentasi", Penerbit Arcan, Jakarta, 118-183.

19. Steenis, C.G.G.J.V. (1987), "Flora Untuk Sekolah di Indonesia", PT. Pradnya Paramita, Jakarta, 239-240.
20. Heywood, V.H. (1985), "Flowering Plants of The World", Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 149-152.
21. Badan Pengendali Bimas. (1974), "Padi, Palawija dan Sayur-Sayuran", Departemen Pertanian, Jakarta, 214.
22. Djide, M.N. (1986), "Identifikasi dan Sifat-Sifat Mikroba Pemecah Pati Yang Diisolasi dari Limbah Pabrik Tapioka di Daerah Bogor", Tesis, fakultas Pasca Sarjana, IPB, Bogor, 2-12.
23. Hadioetomo, R.S. (1990), "Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek : Teknik Prosedur Dasar Laboratorium", PT. Gramedia, Jakarta, 51-52, 55-57.
24. Seley, H.W., dan Dewark, P.J. (1972), "Microbes in Action, A Text Book Manual of Microbiology", W.H. Freeman and Co., San Fransisco, 27-38.
25. Darwis, A.A., dan Sukara, E. (1990), "Penuntun Praktikum : Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim", Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, DITJEN DIKTI, PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor, 13, 18-22, 92-106.
26. Kuswanto, K.R. (1997), "Isolasi dan Pengujian Aktifitas Enzim", PAU Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta, 81-86.
27. Hanafiah, K.A. (1995), "Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi", Edisi Revisi, PT. Raja Grafindo Persada Jakarta, 30-35, 68-70, 224-227.

abel III. Hasil pengukuran serapan L-tyrosin standar pada panjang gelombang 276 nm

No	Konsentrasi (bpj)	Serapan (A)
1	20	0,4859
2	40	0,9608
3	60	1,4413
4	80	1,9217

Persamaan garis regresi : $Y = 0,00545 + 0,0239395X$

dimana :

Y adalah serapan (A)

X adalah konsentrasi (bpj)

a adalah intersep (0,00545)

b adalah slope (0,0239395)

Pengujian korelasi menggunakan persamaan :

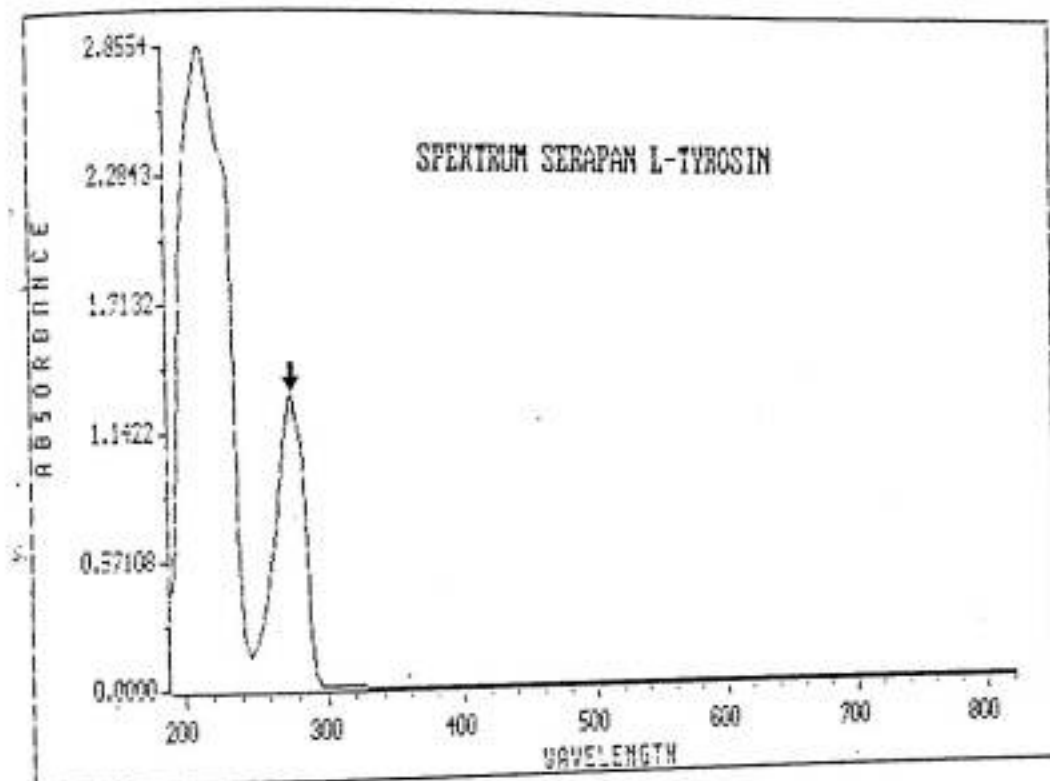
$$r = \frac{\Sigma n \times \Sigma XY - \Sigma X \times \Sigma Y}{\{(n \times \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2) (n \times \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2)\}}$$

Berdasarkan persamaan di atas diperoleh nilai :

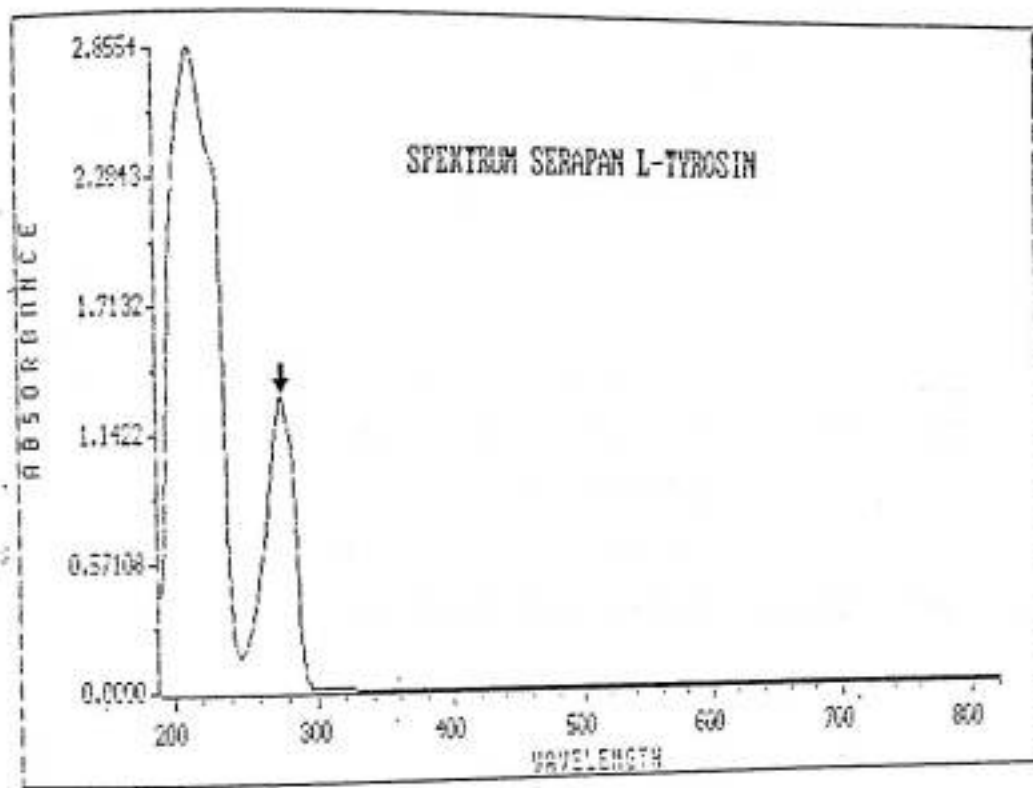
$$r = 0,9995$$

Tabel IV. Hasil pengukuran serapan L-tirosin dalam isolat enzim protease pada panjang gelombang 276 nm dan perhitungan aktifitas enzim protease

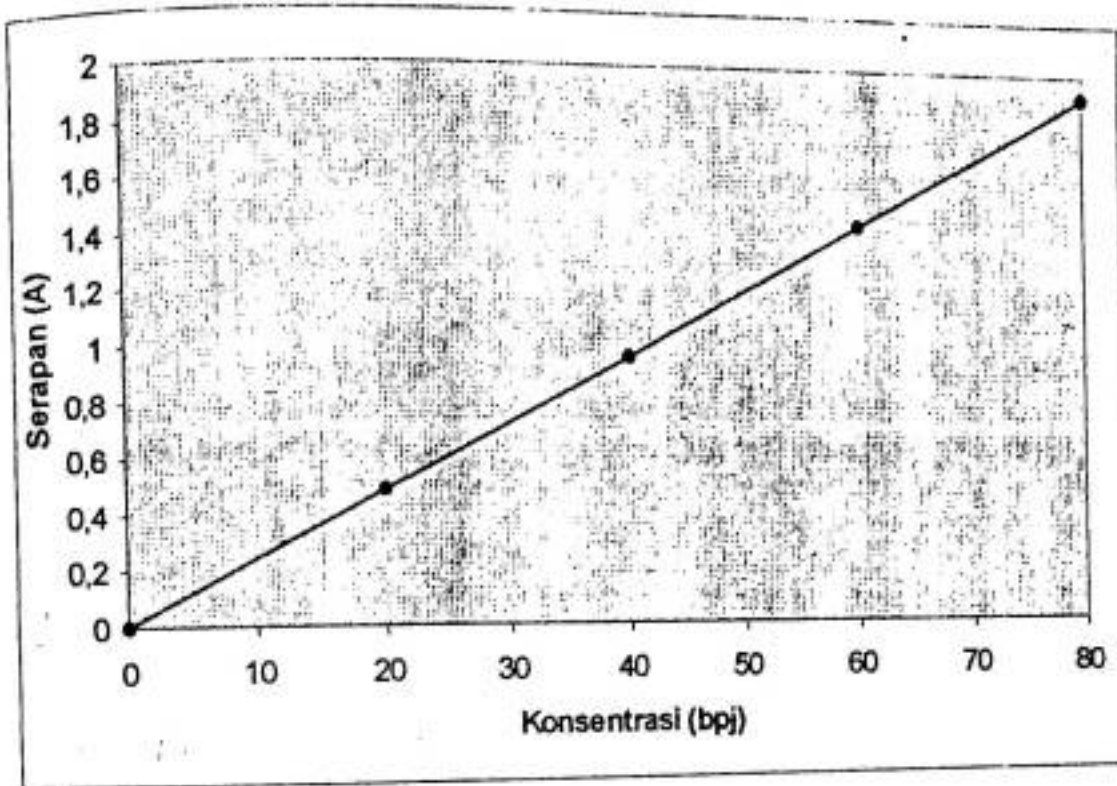
Isolat Enzim Protease	Serapan (A)	Konsentrasi (bpj)	Aktifitas (SAPU/g)
pH 3,5 1	1,1304	47,05439	24,007
2	1,1577	48,19328	24,589
3	1,1401	47,45837	24,214
pH 4,5 1	1,3691	56,99184	28,675
2	1,3713	57,08267	28,722
3	1,4054	58,50230	29,438
pH 5,5 1	1,3062	54,37361	27,271
2	1,3153	54,75091	27,463
3	1,3061	54,37043	27,270
pH 6,5 1	0,7481	31,14304	15,728
2	0,7169	29,84219	15,068
3	0,7807	32,49979	16,419
pH 7,5 1	0,6752	28,10877	14,235
2	0,6423	26,73932	15,536
3	0,7180	29,63131	15,076



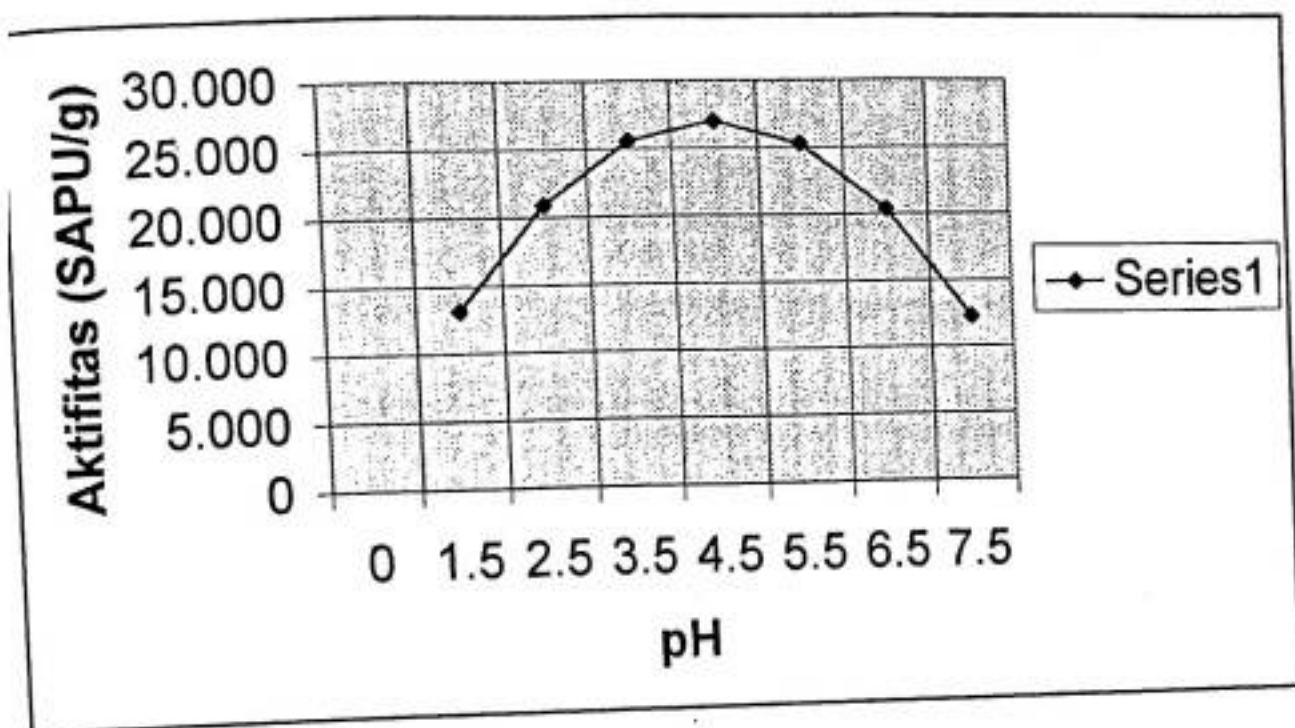
Gambar 1. Spektrum serapan kualitatif L-tyrosin standar pada panjang gelombang 276 nm



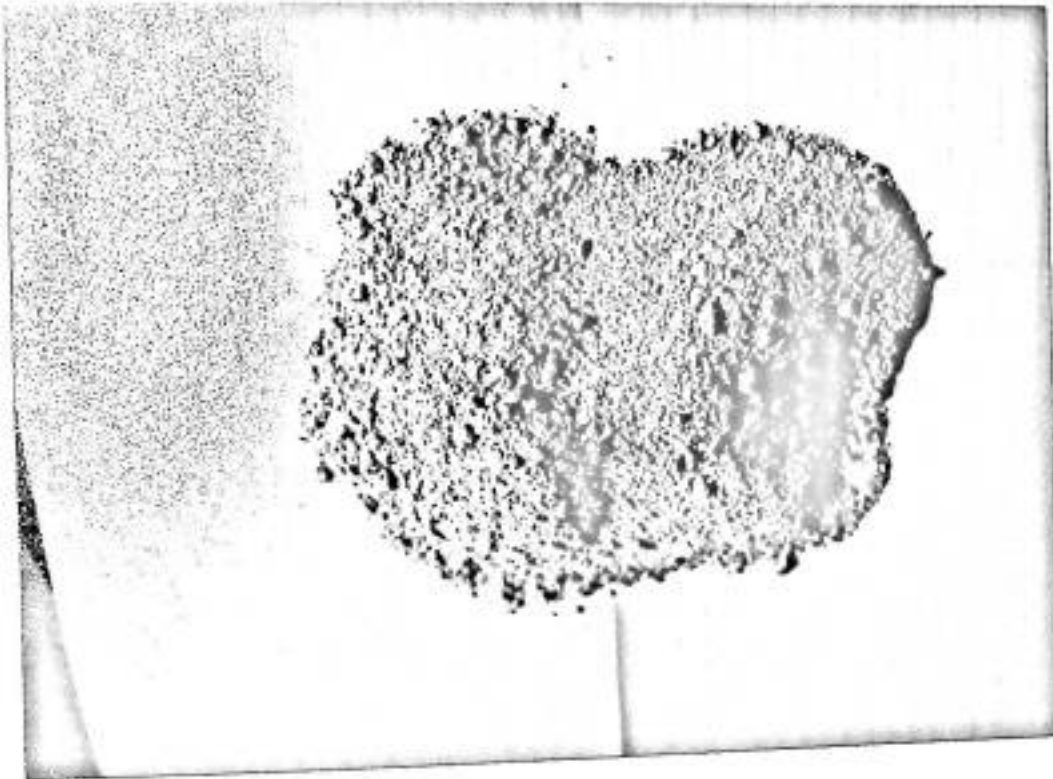
Gambar 2. Spektrum serapan kualitatif L-tyrosin dari isolat enzim protease



Gambar 3. Kurva baku larutan L-tyrosin standar pada panjang gelombang 276 nm



Gambar 4. Kurva hubungan antara pH dengan aktifitas enzim protease (SAPU/g)



Gambar 5. Ampas tahu yang telah dikeringkan dan siap dihaluskan



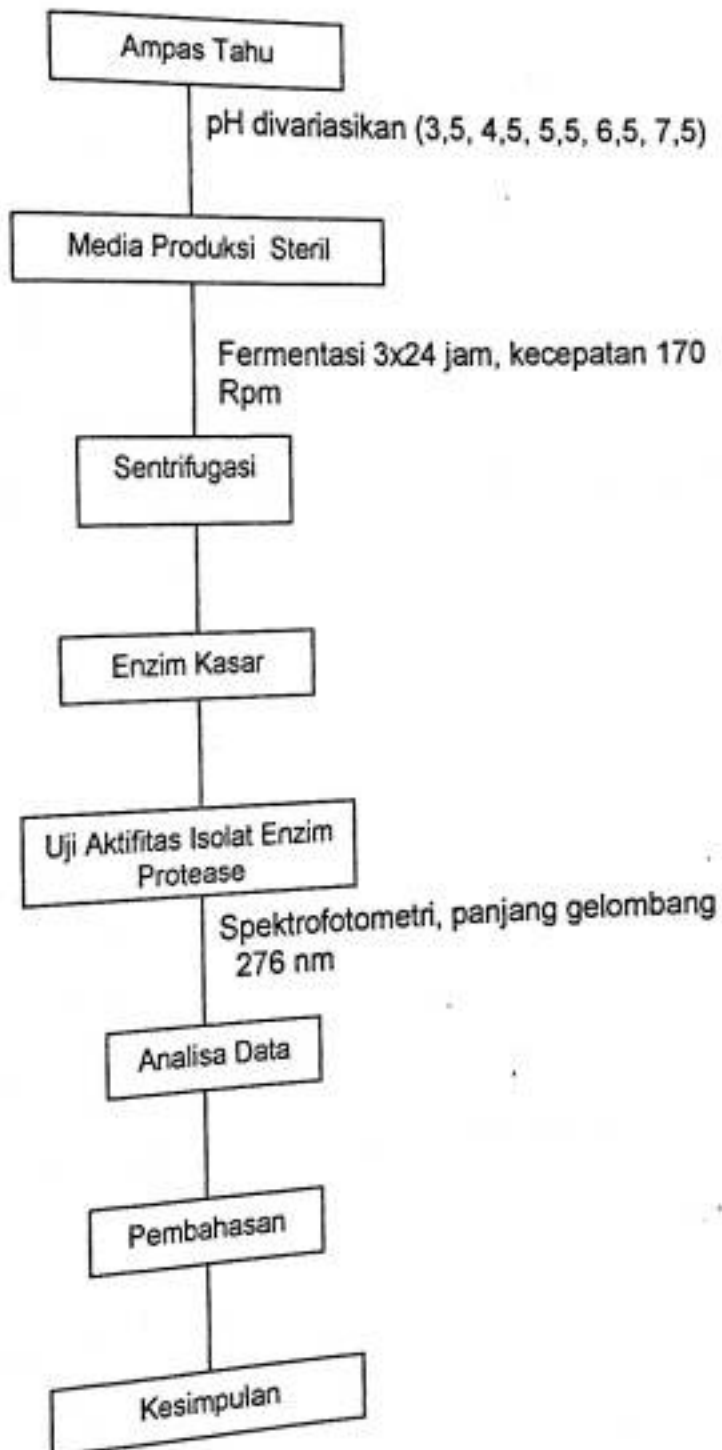
Gambar 6. Medium produksi yang telah difermentasi selama 3 x 24 jam pada suhu kamar dengan intensitas goyangan 170 rpm



Gambar 7. Isolat enzim protease yang berupa enzim kasar yang siap diuji aktifitasnya

Lampiran A

Skema Kerja



Lampiran B

Contoh Perhitungan Aktifitas Isolat Enzim Protease

1. Nama sampel = pH 3,5 1
Serapan (A) = 1,1304
Nilai intersep (I) = 0,00545
Nilai slope (s) = 0,0239395
Berat sampel (W) = 1,4356 g
Aktifitas = $(A - I) \times 22 / s \times 30 \times W$
= $(1,1304 - 0,00545) \times 22 / 0,0239395 \times 30 \times 1,4356$
= 24,007 SAPU/g
2. Nama sampel = pH 4,5 1
Serapan (A) = 1,3691
Nilai intersep (I) = 0,00545
Nilai slope (s) = 0,0239395
Berat sampel (W) = 1,4568 g
Aktifitas = $(A - I) \times 22 / s \times 30 \times W$
= $(1,3691 - 0,00545) \times 22 / 0,0239395 \times 30 \times 1,4568$
= 28,675 SAPU/g
3. Nama sampel = pH 5,5 1
Serapan (A) = 1,3062
Nilai intersep (I) = 0,00545
Nilai slope (s) = 0,0239395

Berat sampel (W) = 1,4611 g

Aktifitas = $(A - I) \times 22/s \times 30 \times W$
 = $(1,3062 - 0,00545) \times 22/ 0,0239395 \times 30 \times 1,4611$
 = 27,271 SAPU/g

4. Nama sampel = pH 6,5 1

Serapan (A) = 0,7481

Nilai intersep (I) = 0,00545

Nilai slope (s) = 0,0239395

Berat sampel (W) = 1,4468 g

Aktifitas = $(A - I) \times 22/s \times 30 \times W$
 = $(0,7481 - 0,00545) \times 22/ 0,0239395 \times 30 \times 1,4468$
 = 15,728 SAPU/g

5. Nama sampel = pH 7,5 1

Serapan (A) = 0,6752

Nilai intersep (I) = 0,00545

Nilai slope (s) = 0,0239395

Berat sampel (W) = 1,4418 g

Aktifitas = $(A - I) \times 22/s \times 30 \times W$
 = $(0,6752 - 0,00545) \times 22/0,0239395 \times 30 \times 1,4418$
 = 14,235 SAPU/g

LAMPIRAN C
Hasil Analisis Data Secara Statistik Dari Isolat Enzim Protease
Menggunakan Metode Regresi Non Linier

Data in File tuti.DAT

AK	pH	pH2
24.01	3.50	12.25
24.59	3.50	12.25
24.21	3.50	12.25
28.67	4.50	20.25
28.72	4.50	20.25
29.44	4.50	20.25
27.27	5.50	30.25
27.46	5.50	30.25
27.27	5.50	30.25
15.73	6.50	42.25
15.07	6.50	42.25
16.42	6.50	42.25
14.23	7.50	56.25
13.54	7.50	56.25
15.08	7.50	56.25

<P>rint or any key to continue>

Untitled 17:58:02 01-Nov-97
 Calculated Coefficients & Estimates of Error for Data in: tuti.DAT

Variable#	Variable	Coefficient	Std. Error	95% CI	T-Value	Mean	Variances
0	Intercept	-4.5290	13.438	29.282			
1	pH	+14.1622	5.120	11.156	+2.766	5.500	1.464
2	pH2	-1.5892	0.463	1.008	-3.434	32.250	16.195

No. of Cods. (n) = 15
 Std. Error of Regression (s) = 2.9991
 Table T-Test value = 2.179 (95%)
 Y-Mean = 22.114 Y-Variance = 6.235

Calculated F-Ratio = 24.26
 Multiple Correlation Coefficient (r) = 0.895
 Variance in Y explained by the Regression = 80.2%
 <P>rint or any key to continue>

Sorting Residuals...

-----Tables of Residuals-----

Original Order				Sorted on Y's			
Cpd	Y(Obs)	Y(Est)	Residual	Cpd	Y(Obs)	Y(Est)	Residual
1	24.007	25.571	-1.564	6	29.438	27.020	2.418
2	24.589	25.571	-0.982	5	28.722	27.020	1.702
3	24.214	25.571	-1.357	4	28.675	27.020	1.655
4	28.675	27.020	1.655	8	27.463	25.291	2.172
5	28.722	27.020	1.702	7	27.271	25.291	1.980
6	29.438	27.020	2.418	9	27.270	25.291	1.979
7	27.271	25.291	1.980	2	24.589	25.571	-0.982
8	27.463	25.291	2.172	3	24.214	25.571	-1.357
9	27.270	25.291	1.979	1	24.007	25.571	-1.564
10	15.729	20.383	-4.655	12	16.419	20.383	-3.964
11	15.068	20.383	-5.315	10	15.728	20.383	-4.655
12	16.419	20.383	-3.964	15	15.076	12.297	2.779
13	14.235	12.297	1.938	11	15.068	20.383	-5.315
14	13.536	12.297	1.239	13	14.235	12.297	1.938
15	13.076	12.297	2.779	14	13.536	12.297	1.239

<P>rint or any key to continue>

For AK the following is estimated:

Independent Variable Values:

pH = 4.456

pH2 = 19.856

AK = 27.023

due to the regression
Total error

Std. Error

2.999

28.187

95% CI

+/- 6.535

+/-61.420

<P>rint or any key to continue>

Dari data di atas diperoleh pers. Parabola :

$$y = -ax^2 + bx + c$$

$$y = -1,5892(\pm 0,463)x^2 + 14,1622(\pm 5,120)x - 4,5290(\pm 13,438)$$

$$\text{titik puncak } (x) = -b/2a$$

$$= -14,1622(\pm 5,120)/2 \times (-1,5892)(\pm 0,463)$$

$$= 4,45$$

dimana $x = \text{pH}$

$$y = \text{aktifitas (sapu/g)}$$

sehingga diperoleh :

$$y = -1,5892(\pm 0,463)(4,45)^2 + 14,1622(\pm 5,120)(4,45) - 4,5290(\pm 13,438)$$

$$= 27,023 \text{ (SAPU/g)}$$

Lampiran D
 Hasil Pengukuran Serapan L-tyrosin Standar
 Pada Panjang Gelombang 276 nm

---> Standard Calibration Report <---

Date : 07-15-1997
 Time : 10:34:42
 Operator : Not Entered

Name : c:l-tyrosi1.STD

Sample Name : L-TYROSIN
 Compound Name :
 Units : ppm

Analytical Wavelength : 276 nm
 Reference Wavelength : None Selected
 Confirmation Wavelengths : None Selected
 Integration Time : 1 seconds

Calibration Function Concentration = +4.163E+01 * Absorbance

STD #	Concentration	Absorbance	% Error
1	20.00000	0.4859	-1.124 %
2	40.00000	0.9608	-1.862 %
3	60.00000	1.4413	-0.770 %
4	80.00000	1.9217	+1.330 %

Lampiran E

Hasil Pengukuran Serapan dan Konsentrasi L-tyrosin Dalam Isolat Enzim Protease Pada Panjang Gelombang 276 nm

---> Quantitation Results Report <---

Date : 07-15-1997
Time : 10:36:34
Operator : Not Entered

File Name : c:l-tyro.QRS

Sample Name : L-TYROSIN
Unit Name :
Units : ppm
Factor : 1.00

Analytical Wavelength : 276 nm
Reference Wavelength : None Selected
Confirmation Wavelengths : None Selected
Integration Time : 1 seconds

#	Sample Name	Wavelength	Func. Res.	Concentration
	pH 3.5 1	Analytical	+1.1304	47.05439
	pH 3.5 2	Analytical	+1.1577	48.19328
	pH 3.5 3	Analytical	+1.1401	47.45837
	pH 4.5 1	Analytical	+1.3691	56.99184
	pH 4.5 2	Analytical	+1.3713	57.08267
	pH 4.5 3	Analytical	+1.4054	58.50230
	pH 5.5 1	Analytical	+1.3062	54.37361
	pH 5.5 2	Analytical	+1.3153	54.75091
	pH 5.5 3	Analytical	+1.3061	54.37043
	pH 6.5 1	Analytical	+0.7481	31.14304
	pH 6.5 2	Analytical	+0.7169	29.84219
	pH 6.5 3	Analytical	+0.7807	32.49979
	pH 7.5 1	Analytical	+0.6752	28.10877
	pH 7.5 2	Analytical	+0.6423	26.73932
	pH 7.5 3	Analytical	+0.7118	29.63131