

Optimisasi Enzim Protease oleh Bakteri Endofit dari Akar Tumbuhan Kawasan Ekosistem Karst dengan Response Surface Methodology

Optimization of Protease Enzymes by Endophytic Bacteria from Roots of Karst Ecosystem Areas with Response Surface Methodology

Halifah Pagarra^{1)*}, Hartati¹⁾ dan Rachmawaty¹⁾

¹⁾ Program Studi Biologi Jurusan Biologi, Universitas Negeri Makassar

Received 19th August 2021 / Accepted 03rd September 2021

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas produksi enzim protease dari isolat bakteri B yang diisolasi dari Akar tumbuhan karst dalam berbagai variasi waktu inkubasi. Isolat bakteri yang digunakan adalah isolat bakteri B, bakteri proteolitik termofilik yang diisolasi dari Ekosistem Karst di Kabupaten Pangkajene, Sulawesi Selatan Propinsi. Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan metode Lowry. Protein kasar tertinggi. Kandungan protein dari semua perlakuan diperoleh pada waktu inkubasi 48 jam untuk Isolat Bakteri B sebesar 4,665 mg/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Isolat Bakteri B menunjukkan waktu produksi yang optimal pada 48 jam dengan enzim aktivitas 0,393 Unit/ml. Dapat disimpulkan bahwa Isolat Bakteri B merupakan bakteri proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada SMA. Produksi dari enzim protease yang diperoleh melalui metode RSM (CCD) optimum pada 0,393 U/ml pada glukosa konsentrasi 0,60%, ekstrak ragi 0,50% dan susu skim 1,00%.

Kata kunci: protein kasar, aktivitas enzim protease dan isolat bakteri B.

ABSTRACT

This study aims to determine the activity of protease enzyme production from bacterial isolate B isolated from the roots of karst plants in various incubation times. The bacterial isolate used was bacterial isolate B, a thermophilic proteolytic bacterium isolated from the Karst Ecosystem in Pangkajene Regency, South Sulawesi Province. Testing of protease activity was carried out using the Lowry method. Highest crude protein. Protein content of all treatments was obtained at 48 hours of incubation for Bacterial Isolate B (5.756 mg/ml). The results showed that Bacterial Isolate B showed optimal production time at 48 hours with enzyme activity 0.393 Unit/ml. It can be concluded that Bacterial Isolate B is a proteolytic bacterium characterized by the formation of a clear zone around the bacterial colonies in SMA. The production of the protease enzyme obtained by the RSM (CCD) method was optimum at 0.393 U/ml at 0.60% glucose concentration, 0.50% yeast extract and 1.00% skim milk.

Keywords: crude protein, activity of protease enzymes and isolates of bacteria B.

*Korespondensi:

email: halifah.pagarra@unm.ac.id

PENDAHULUAN

Produksi enzim di seluruh dunia merupakan salah satu produk unggulan dari enzim termofilik yang digunakan dalam pengolahan makanan, deterjen dan industri farmasi. Enzim protease adalah salah satu enzim industri yang paling banyak digunakan yang merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida menjadi oligopeptida dan asam amino (Marnolia dkk, 2016).

Enzim protease mewakili salah satu dari tiga kelompok enzim industri terbesar dan menemukan aplikasi. Sumber enzim protease yang diketahui berasal dari hewan, mikroba dan tumbuhan. Tumbuhan merupakan sumber enzim protease terbesar (43,85%) diikuti oleh bakteri (18,09%), jamur (15,08%), hewan (11,15%), alga (7,42%) dan virus (4,41%) ((Mahajan dan Shumatt. 2010).

Mikroorganisme endofit (jamur dan bakteri) adalah mikroorganisme berada di dalam tanaman dan ditemukan di jaringan seperti daun, cabang, dan akar yang tidak menyebabkan kerusakan pada tuan rumah. Mikroorganisme endofit menempati lokasi yang relatif belum banyak di kaji sehingga dapat mewakili sumber baru dalam memperoleh lebih banyak enzim yang berpotensi (Carrim dkk., 2006).

Bakteri endofit dari tanaman karst merupakan tanaman yang mudah tumbuh di daerah berkapur, tidak memerlukan perawatan yang intensif, tahan terhadap musim kemarau dan musim hujan dan mudah dikembangbiakkan dengan berbagai manfaat. Beberapa hasil penelitian menunjukkan keunggulan bakteri endofit. Hasil penelitian oleh Munif dan Yadi (2021), menunjukkan bahwa potensi bakteri endofit baik sebagai agens biokontrol untuk mengendalikan *M. graminicola* pada tanaman padi; Camila dkk (2019) menunjukkan potensi bakteri yang dapat menekan pertumbuhan *Phytophthora Palmivora*: secara in vitro, selanjutnya hasil penelitian Yulianti Tatiek (2013), menunjukkan bahwa bakteri endofit berperan sebagai agensia pengendali hayati serangga hama dan penyakit tanaman. dalam dunia pertanian, khususnya tanaman perkebunan.

Berdasarkan potensi dari bakteri endofit ini maka dilakukan penelitian untuk memanfaatkan tanaman dari daerah karst untuk mendapatkan isolat bakteri endofit. Tujuan dari penelitian ini adalah isolasi mikroorganisme endofit dari akar tumbuhan karst dan produksi enzim protease oleh isolat. Lebih khusus lagi, untuk menentukan aktivitas protease enzim dari isolat bakteri B yang diisolasi dari akar tanaman Karst dalam berbagai variasi waktu inkubasi. Bakteri isolat yang digunakan adalah isolat bakteri B, bakteri proteolitik termofilik yang diisolasi dari Ekosistem Karst di Kabupaten Pangkajene, Provinsi Sulawesi Selatan. Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan metode Lowry (Yuniarti dkk, 2015).

METODE

Pengambilan sampel akar tanaman sebagai bahan penelitian dilakukan di Ekosistem Karst, Kabupaten Pangkep. Sampel akar tanaman di masing-masing ekosistem diambil menggunakan parang, sampel akar tanaman kemudian dimasukkan ke dalam sampel plastik. Maka sampelnya adalah dimasukkan ke dalam cool box dan dibawa ke laboratorium. Seleksi mikroorganisme dilakukan pada bakteri endofit isolat akar tumbuhan yang berasal dari

ekosistem karst di Kabupaten Pangkep. Medium yang digunakan adalah susu skim agar, 10% susu skim cair (yang disterilkan pada suhu 110°C selama 10 menit) dan media GYS yang mengandung 0,3% glukosa, 1% ekstrak ragi, 2% susu skim (Astutiati, 2010) dalam erlenmeyer 250 mL berisi 50 mL medium. Seleksi Bakteri Endofit dilakukan pada media agar susu skim pada cawan Petri berisi 15 mL media padat. Bakteri endofit umur 24 jam diinokulasikan pada media susu skim menggunakan tusuk gigi steril kemudian diinkubasi selama 72 jam. Zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan metode Sukara (1989).

Selanjutnya dilakukan Uji Koagulasi pada Medium Skim Susu Cair, dimana suspensi bakteri endofit 24% 2% (kultur bakteri dalam tabung yang dilarutkan dengan 2,5 mL steril) air suling) diinokulasikan ke dalam 5 mL medium susu skim cair 10% dalam tabung reaksi dan inkubasi selama 7 hari. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan medium (koagulasi, warna medium dan pH) (modifikasi Saran, *et al.*, 2007).

Perlakuan berikutnya adalah proses fermentasi. Suspensi isolat bakteri terbaik diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 250 mL berisi 50 mL sedang sebanyak 3%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Sampel yang difermentasi adalah disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Data yang diperoleh selanjutnya di analisis secara kualitatif. untuk menggambarkan morfologi bakteri endofit yang di isolasi dari suspensi akar tumbuhan karst dan diberi simbol isolat bakteri B. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim protease, dimana filtrat dari sampel fermentasi diukur kandungan proteinnya menggunakan metode Hanson dan Philips (1981). Analisis aktivitas enzim protease menggunakan metode Arima *et al.* (1968) yang telah dimodifikasi. Optimasi produksi enzim protease menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan percobaan *Central Composite Design* (CCD). Analisis dilakukan menggunakan *Software Statistic Design Expert 6.0.* (Montgomery, 2001).

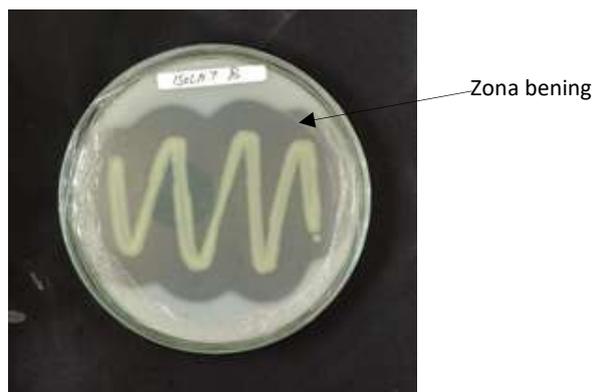
Untuk mengetahui aktivitas enzim dilakukan Uji Aktivitas Enzim Protease.. Sebanyak 0,5% kasein dilarutkan dalam 0,02 M buffer Kalium Fosfat sambil dipanaskan di atas penangas. Setelah larut, diambil 1,25 mL substrat kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan pada suhu 35°C selama 30 menit dalam penangas air. Selanjutnya ditambahkan 0,25 ul enzim dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit (bila perlu enzim diencerkan terlebih dahulu) kemudian dikeluarkan dan ditambahkan 1,25 mL TCA (0,44 M) lalu dikocok menggunakan vortex, kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Filtrat diambil sebanyak 0,5 mL kemudian ditambahkan 1,25 mL Na₂CO₃ (0,55 M) dan 0,5 mL Folin, kemudian dicairkan kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 20 menit. Terakhir diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm (Arima *et al.*, 1968).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikroorganisme endofit (jamur dan bakteri) adalah mikroorganisme yang menghuni bagian dalam tumbuhan pada paling tidak dalam periode siklus vital, dan ditemukan di jaringan seperti daun, cabang, dan akar. endofit ini mikroorganisme tidak menyebabkan kerusakan pada inang, yang membedakannya dari fitopatogenik mikroorganisme. Menurut (Jain *et al.*, 2012) bahwa sebuah protease (juga disebut peptidase atau proteinase) adalah

setiap enzim yang melakukan proteolisis, yang adalah, memulai katabolisme protein dengan hidrolisis ikatan peptida yang menghubungkan asam amino bersama-sama di rantai polipeptida yang membentuk protein. Mereka memiliki beragam aplikasi di berbagai industri seperti biskuit pembuatan, industri pembuatan bir.

Uji aktivitas proteolitik dilakukan pada bakteri endofit isolat B menggunakan SMA. Sebuah tes positif adalah ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media SMA. Hasil tes kualitatif menunjukkan bahwa isolat B merupakan bakteri proteolitik karena mampu menghasilkan enzim protease yang bersifat ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri. Isolat B yang terbukti memiliki aktivitas proteolitik kemudian digunakan sebagai starter dalam proses produksi enzim protease. Aktivitas proteolitik isolat bakteri B pada media SMA ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji kualitatif aktivitas proteolitik Isolat bakteri B pada media SMA.

Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa, secara morfologi isolat bakteri B mempunyai bentuk pinggirannya bergerigi dan disekitar koloni bakteri endofit berbentuk bulat (*coccus*). Koloni isolat bakteri berwarna putih dan disekitar koloni terbentuk zona bening. Hal ini menunjukkan bahwa ada enzim protease yang dihasilkan. Menurut Susanti, bahwa enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri endofit dapat medegradasi protein dalam medium susu skim agar (SMA), yaitu dengan cara memutuskan rantai ikatan peptida dengan masuknya air ke dalam molekul sehingga ikatan peptida berubah menjadi rantai pendek dan asam - asam amino yang menyebabkan perubahan warna susu menjadi tidak berwarna atau bening (zona bening). Jadi dapat dikatakan bahwa protein yang terkandung dalam media selektif SMA bertindak sebagai penginduksi enzim protease. Zona bening yang dihasilkan merupakan hasil dari hidrolisis substrat protein yang terdapat pada media SMA oleh enzim protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Media SMA mengandung pepton dan susu skim sebagai sumber karbon utama untuk kebutuhan metabolisme bakteri.

Aktivitas proteolitik isolat Bakteri B pada media SMA ditunjukkan pada Gambar 1. Protein yang terkandung dalam media selektif SMA bertindak sebagai penginduksi enzim protease. Zona bening yang dihasilkan merupakan hasil hidrolisis substrat protein yang terdapat pada media SMA oleh enzim protease yang dihasilkan oleh isolat Bakteri B.

Media SMA mengandung pepton dan susu skim sebagai sumber karbon utama untuk kebutuhan metabolisme bakteri. Penentuan kadar protein kasar dilakukan secara kuantitatif. Gambar 2, menunjukkan hasil pengujian kadar protein kasar pada setiap perlakuan.

Kandungan protein kasar tertinggi dari semua perlakuan diperoleh pada 48 jam waktu inkubasi untuk Isolat Bakteri B (4,665 mg/ml).

Penentuan waktu produksi optimal dilakukan pada waktu produksi 0, 24, 48, 72 dan 96 jam dengan Isolat Bakteri B. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Isolat Bakteri B menunjukkan waktu produksi yang optimal pada 48 jam dengan aktivitas enzim protease 0,381 Unit/ml.

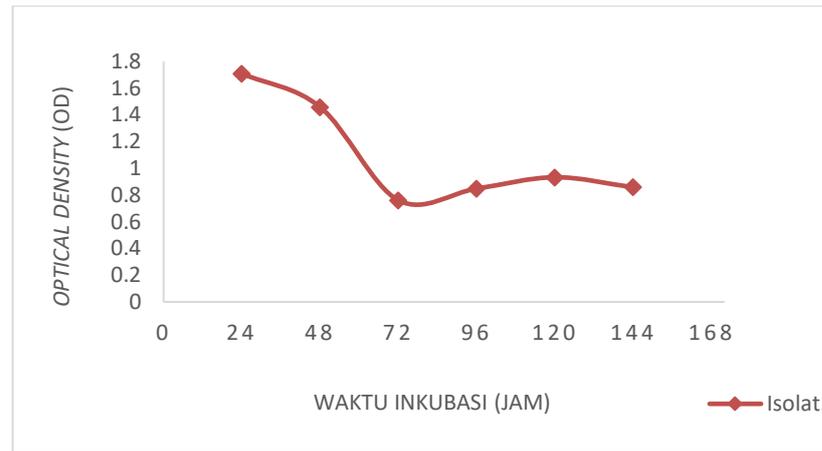
Setelah mencapai waktu produksi yang optimal, Isolat Bakteri B mengalami penurunan aktivitas enzim. Peningkatan aktivitas enzim pada awal waktu produksi diduga disebabkan oleh tersedianya sejumlah besar nutrisi yang dibutuhkan oleh sel bakteri untuk melakukan metabolisme sel. Pada akhir waktu produksi enzim, ada penurunan aktivitas proteolitik yang dapat terjadi karena berkurangnya jumlah substrat yang akan menghambat pembentukan kompleks substrat enzim dan perubahan struktur enzim yang akan menyebabkan penurunan kecepatan katalitik. Karena perubahan struktur enzim, sisi aktif enzim berubah bentuk sehingga sehingga tidak dapat digunakan dengan baik dalam mengikat substrat. Kemungkinan lain adalah bahwa bakteri membutuhkan nutrisi asam amino (Yuniati, 2015).

Pola Pertumbuhan Isolat Bakteri B

Kurva pertumbuhan Isolat Bakteri B dapat ditentukan dengan mengukur kekeruhan media yang digunakan untuk pertumbuhan pada medium dengan selang waktu tertentu untuk mengetahui kemampuan bakteri tersebut dalam memperbanyak sel. Pengukuran kekeruhan menggunakan spektrofotometer tanpa menghitung jumlah mikroba yang sebenarnya, karena molekul besar yang terkandung dalam media juga dihitung ketika terkena cahaya pada saat perhitungan.

Menurut Susanti (2003), kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh, berkembang, berkembang biak, dan mensekresi enzim ke media kultur. Kurva pertumbuhan bakteri bertindak untuk menentukan waktu di mana mikroba masuk final fase logaritmik atau awal fase diam, hal ini dilakukan untuk mendapatkan enzim yang maksimal. Yuniati, (2015), menjelaskan bahwa setelah mencapai waktu produksi yang optimal, Isolat Bakteri B mengalami penurunan aktivitas enzim. Peningkatan aktivitas enzim pada awal waktu produksi diduga disebabkan oleh tersedianya sejumlah besar nutrisi yang dibutuhkan oleh sel bakteri untuk melakukan metabolisme sel. Pada akhir waktu produksi enzim, ada penurunan aktivitas proteolitik yang dapat terjadi karena berkurangnya jumlah substrat yang akan menghambat pembentukan kompleks substrat enzim dan perubahan struktur enzim yang akan menyebabkan penurunan laju katalitik. Karena perubahan struktur enzim, sisi aktif enzim berubah bentuk sehingga sehingga tidak dapat digunakan dengan baik dalam mengikat substrat. Kemungkinan lain adalah bahwa bakteri membutuhkan nutrisi asam amino.

Optical Density atau Kepadatan Optik dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm menunjukkan tetapan yang mengandung kultur bakteri yang tumbuh, selama masa inkubasi dari 0 jam hingga 144 jam.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri endofit Isolat B pada medium SMA

Rekaman perubahan OD dari tetesan yang mengandung kultur bakteri ditunjukkan pada Gambar 5. Tampak bahwa densitas optik meningkat dari fase lag melalui fase log ke OD = 1,707, dan kemudian sedikit menurun dalam fase kematian dan fase lag dapat diabaikan. Selama fase log pada 0 jam hingga 24 jam masa inkubasi peningkatan yang kuat (optimum) dengan Kepadatan optik (OD) sebesar 0,1707. Setelah 24 jam, kekeruhan medium yang mengandung bakteri menurun tajam dan penurunan ini juga berlanjut pada fase kematian. Sejalan dengan yang di jelaskan oleh Nagar *et al.* 2010), bahwa hal ini disebabkan perbandingan komposisi didalam medium sangat mendukung bakteri untuk hidup dan berkembang biak serta sumber karbon yang terdapat pada media sehingga menghasilkan nilai aktifitas tinggi.

Optimasi Enzim Protease Menggunakan Desain Eksperimental dan Analisis Statistik

Yang melibatkan tiga faktor yang berbeda. Percobaan dilakukan secara acak. CCD berisi total 20 percobaan eksperimental yang melibatkan replikasi titik pusat. Variabel terikat yang dipilih untuk ini penelitian adalah aktivitas enzim Protease (U/ml). Variabel bebas yang dipilih adalah kadar glukosa (%), A; ekstrak ragi (%) B dan susu skim (%), C. Setelah percobaan, persamaan polinomial orde kedua (1) ditunjukkan di bawah ini digunakan untuk menggambarkan pengaruh variabel dalam hal linear, kuadrat dan produk lintas istilah. Di dalam CCD, kisaran dan tingkat variabel yang diselidiki dalam penelitian ini adalah seperti yang diberikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai aktual dari faktor-faktor dalam desain komposit pusat

Faktor	Satuan %	Tingkat				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Glukosa	%	0,60	0.20	0.40	0.60	0.74
Ekstrak Ragi	%	0.16	0.50	0.100	0.15	1.84
Susu Skim	%	0.32	1.00	2.00	3.00	3.68

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{11}A_2 + b_{22}B_2 + b_{33}C_2 + b_{12}AB + b_{13}AC_2 + b_{23}BC \quad (1)$$

Dimana, Y menyatakan aktivitas enzim protease (U/ml), b_0 adalah suku intersep; b_1 , b_2 , b_3 linier koefisien; b_{11} , b_{22} , b_{33} koefisien kuadrat dan b_{12} , b_{13} , b_{23} adalah koefisien interaksi. Kombinasi faktor (seperti AB) mewakili interaksi antara faktor individu dalam istilah itu. Maka jawabannya adalah fungsi dari tingkat faktor. Grafik permukaan respons menunjukkan pengaruh variabel secara individual dan dalam kombinasi dan menentukan tingkat optimum untuk produksi protease maksimal. Untuk memvalidasi prediksi ini, budidaya labu menggunakan komposisi media yang sepenuhnya dioptimalkan dilakukan tiga kali. Sedangkan A, B, dan C masing-masing mewakili glukosa, ekstrak ragi dan susu skim.

Optimisasi Aktivitas Enzim Protease

Hasil optimasi enzim protease dianalisis dengan analisis varians. glukosa, ekstrak ragi, susu skim dan interaksi antara glukosa dan ekstrak ragi, glukosa dan susu skim dan ekstrak ragi dan susu skim dalam cara berpengaruh nyata terhadap produksi enzim protease seperti terlihat pada Tabel 2. Berdasarkan hasil ANOVA, model regresi terbaik (Tabel 3) dengan nilai regresi (R^2) sebesar 0,95 ditentukan dengan menggunakan Persamaan 2. A, B dan C masing-masing menunjukkan glukosa, ekstrak yeast (ragi) dan susu skim sedangkan Y adalah aktivitas enzim protease. Regresi koefisien dan signifikansi model *Respon Surface Quadratic* dapat dilihat pada Tabel 3.

$$Y \text{ (U/ml)} = 0,23 + 0,019A - 0,012B + 6,916C - 6,795A^2 + 0,012B^2 - 2,022C^2 - 0,044AB - 0,017AC + 0,056BC \quad (2)$$

Tabel 2. Analisis Regresi (ANOVA) Aktivitas Enzim Protease menggunakan 2 – level desain faktorial

Sumber	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rata-rata	Nilai F	P>F	R ²
Model	0,53	9	5,928	28,50 ^a	<0,0001 ^b	0,9625
A	4,959	1	4,959	23,84	0,0006	
B	1,948	1	1,948	9,37	0,0120	
C	6,533	1	6,533	3,14	0,1067	
A ²	6,655	1	6,655	3,20		
B ²	1,995	1	1,995	9,59		
C ²	5,895	1	5,895	0,28		
AB	0,015	1	0,015	73,64	0,0001	
AC	2,380	1	2,380	11,45	0,0070	
BC	0,025	1	0,025	120,64	0,0001	
Sisaan	2,080	10	2,080			
Ketidakpasan	1,382	5	2,764	1,98	0,2354 ^c	
Kesalahan mutlak	6,973	5	1,395			
Jumlah Korelasi	0,055	19				

^aNilai-F adalah signifikan.

^bModel adalah signifikan, dengan $P > F$ rendah dari 0.05.

^cModel adalah cocok disebabkan oleh nilai-F yang tidak signifikan.

Simpangan baku 0,014

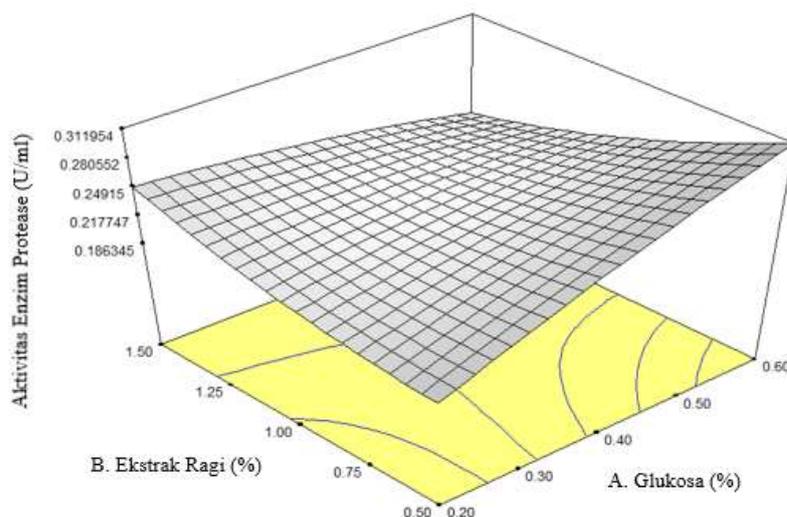
Optimisasi Enzim Protease oleh Bakteri Endofit dari AkarTumbuhan Kawasan Ekosistem Karst dengan Response Surface Methodology

Berdasarkan hasil ANOVA, model regresi terbaik (Tabel 3) dengan nilai Regresi (R^2) dari 0,9625 adalah ditentukan menggunakan Persamaan 2. A, B dan C masing-masing menunjukkan glukosa, ekstrak ragi dan susu skim sedangkan Y adalah aktivitas enzim protease (Persamaan 2). Koefisien regresi dan signifikansi model Respon Permukaan Kuadrat dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Koefisien regresi dan signifikansi model Permukaan Respon Kuadrat

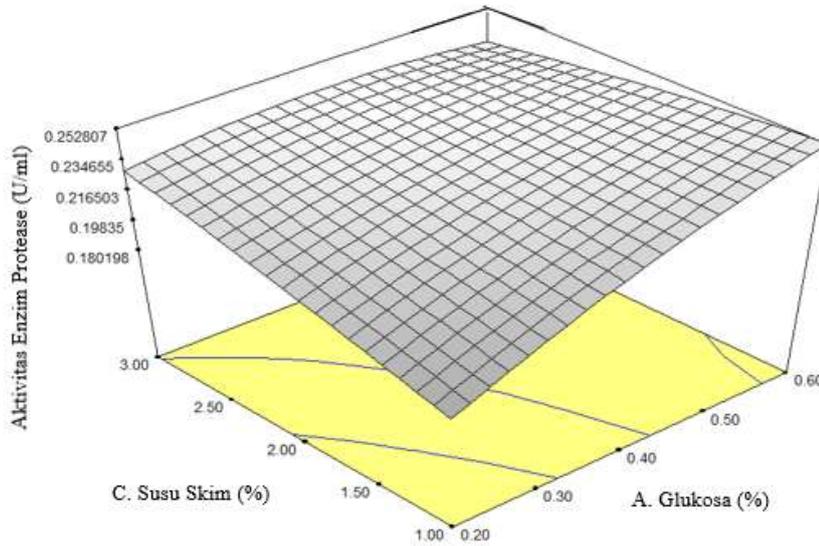
Faktor	Perkiraan Koefisien	Derajat Bebas	Kesalahan Standar	Selang Kepercayaan <95% CI	Selang Kepercayaan >95% CI
A - Glukosa	0,019	1	3,902	0,010	0,028
B - Ekstrak Ragi	0,012	1	3,902	0,021	3,247
B ²	0,012	1	3,799	3,302	0,020
AB	0,044	1	5,098	0,055	0,032
AC	0,017	1	5,098	0,029	5,890
BC	0,056	1	5,098	0,045	0,067

Grafik hasil percobaan divisualisasikan dalam bentuk tiga dimensi dan kontur plot permukaan respon yang menunjukkan hubungan antara dua faktor yang berinteraksi dengan enzim protease Glukosa dan konsentrasi ekstrak ragi dan interaksinya memiliki pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas protease enzim yang dihasilkan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Konsentrasi glukosa dan ekstrak ragi dan interaksinya memiliki berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan seperti terlihat pada Gambar 3. Demikian pula konsentrasi ekstrak ragi dan susu skim dan interaksi yang ditunjukkan pada Gambar 4 juga memiliki pengaruh yang signifikan pada aktivitas enzim protease yang dihasilkan



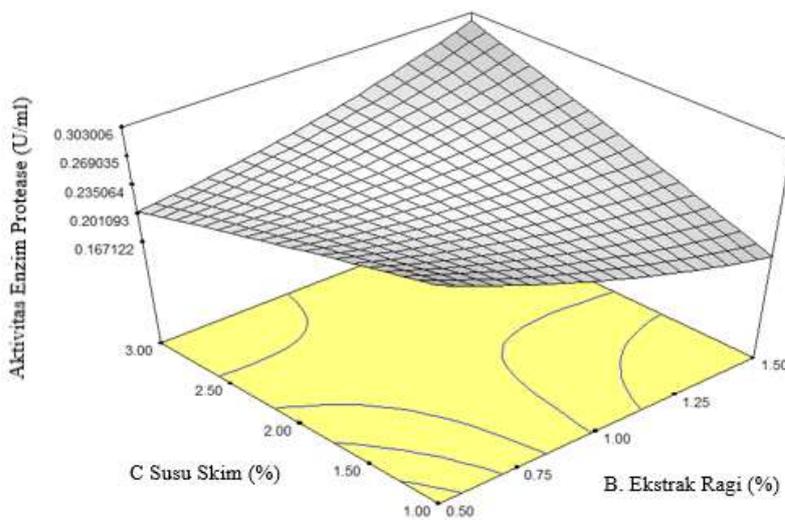
Gambar 3 Plot Respon Permukaan dari aktivitas enzim protease: efek glukosa dan ekstrak.ragi

Gambar 3 menunjukkan pengaruh glukosa dan ekstrak ragi terhadap aktiviti enzim protease. Pengaruh glukosa dan ekstrak ragi menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap aktiviti enzim protease dengan konsentrasi susu skim sebesar 2.00%. Aktiviti enzim protease dapat meningkat dan enurun dalam kisaran tertentu oleh kedua faktor tersebut jika di atur pada tingkat yang terlalu tinggi atau terlalu rendah.



Gambar 4. Plot Respon Permukaan dari aktivitas enzim protease: efek glukosa dan susu skim

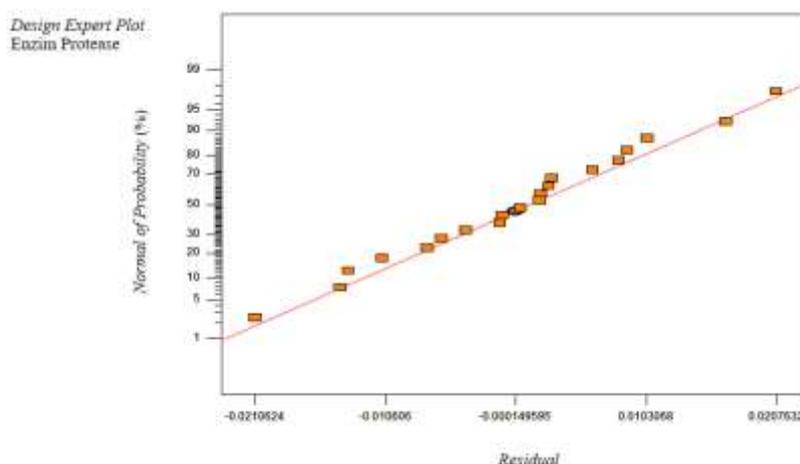
Gambar 4 menunjukkan pengaruh glukosa dan susu skim terhadap aktiviti enzim protease. Pengaruh glukosa menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap aktiviti enzim protease dengan konsentrasi ekstrak ragi sebesar 1.00%. Aktiviti enzim protease dapat meningkat dan menurun dalam kisaran tertentu oleh kedua faktor tersebut jika di atur pada tingkat yang terlalu tinggi atau terlalu rendah



Gambar 5 Plot Respon Permukaan dari aktivitas enzim protease: efek ekstrak.ragi dan susu skim

Gambar 5 menunjukkan pengaruh ekstrak ragi dan susu skim terhadap aktiviti enzim protease. Pengaruh ekstrak ragi menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap aktiviti enzim protease dengan konsentrasi glukosa sebesar 0.40%. Aktiviti enzim protease dapat meningkat dan menurun dalam kisaran tertentu oleh kedua faktor tersebut jika di atur pada tingkat yang terlalu tinggi atau terlalu rendah.

Uji distribusi normal dilakukan untuk mengamati penyimpangan model. Residual dinyatakan telah mengikuti distribusi normal jika pada plot kenormalan residual, titik residual yang dihasilkan telah sesuai atau mendekati garis lurus yang ditentukan (Kamelia dkk, 2019). Gambar 6 menunjukkan titik residual yang dihasilkan mendekati garis lurus sehingga uji kenormalan residual telah mengikuti distribusi normal.



Gambar 6. Plot *Normal of Probabilty* dari pengaruh faktor Glukosa (A), Ekstrak ragi (B) dan Susu Skim (C) terhadap Aktiviti Enzim Protease.

Gambar plot *Normal of Probality* tersebut menunjukkan bahwa simbol faktor yang jauh dari garis linier merupakan faktor yang signifikan terhadap aktiviti enzim protease. Pengaruh Glukosa (A), Ekstrak Ragi (B) dan Susu Skim (C) jelas terlihat tidak terlalu jauh dari garis yang menunjukkan sinyal yang kuat. Hasil ini berkorelasi dengan nilai $P < 0.0001$ (Tabel 2). Faktor signifikan lainnya adalah faktor interaksi antara glukosa dan ekstrak ragi (faktor AB), glukosa dan susu skim (AC) dan ekstrak ragi dan susu skim (BC).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa secara morfologi isolat bakteri B berbentuk bulat dan berwarna putih dan digolongkan sebagai bakteri proteolitik yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada SMA. Sedangkan fase eksponensial bakteri pertumbuhan pada inkubasi 48 jam dengan kerapatan optik 1.707. Bakteri isolat B memiliki waktu produksi protein kasar optimum sebesar 4,665 mg/ml pada waktu inkubasi 48 jam dan aktivitas enzim protease sebesar 0,393 Unit/ml.pada waktu inkubasi 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri B sebagai bakteri proteolitik yang berpotensi menghasilkan enzim protease.

DAFTAR PUSTAKA

- Arima K, Yu J, Iwasaki S, Tamura G (1968). Milk-clotting enzim from microorganism: Purification and crystallization of Mucor rennin from Mucor pusillus var. Lindt. *Applied Microbiology* 16(11): 1747-1733.
- Camila, S.F., Rai, G.R.M.T. dan Khalimi, K. (2019). Potensi bakteri endofit dalam menekan pertumbuhan *Phytophthora palmivora* (butler) Secara In vitro. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 8 (4): 388-398.
- Carrim AJI, Barbosa EC, Vieira JDG (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(3): 353-359.
- Jain P, Aggarwal V, Sharma A, Pundir RK (2012). Isolation, production and partial purification of protease from an endophytic *Acremonium* sp. *J. Agric. Tech*, 8: 1979-1989.
- Kamelia, G.P., Ginting, K. dan Kleden, A. M. (2019). Penerapan Metode Respon Permukaan Dalam Optimalisasi Laba Usaha Pertanian Tanaman Kangkung Darat. *Jurnal Diferensial*. 1(1): 1-10.
- Mahajan RT, Dan Shamnkant BB (2010). Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review. *India J. Pharm. Research* 3(9): 2048-2068.
- Marnolia, A., Haryani, Y. dan Puspita, F. (2016). Uji Aktivitas Enzim Protease Dari Isolat *Bacillus* sp. Endofit Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis quinensis*). *Jurnal Photon*. 6(2): 1-5.
- Mehzard J, Desrosier C, Lauzon, Robitaille G, Zhao X, Lacasse P (2005). Zymogram Technique for Proteolytic Assay. *J Dairy Sci.*, 88: 211-222.
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*. 5th Edition, John Wiley and Sons, Inc. New York
- Munif Abdul dan Yadi, M.N.(2021). Potensi Beberapa Isolat Bakteri Endofit untuk Pengendalian Biologi *Meloidogyne graminicola* pada Tanaman Padi.. *Jurnal Fitopatologi*, 17 (1): 28–34.
- Nagar, S., R.K. Jain, V.V. Thakur and V.K. Gupta. 2010. Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S. *Biotech*. 3: 1-9
- Saran S, Isar J, Saxena RK (2007). A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 70: 697-699.
- Sukara E, Doelle HW (1989). *A one-step process for the production of single-cell protein and amyloglucosidase*. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 135-140.

Optimisasi Enzim Protease oleh Bakteri Endofit dari AkarTumbuhan Kawasan Ekosistem Karst dengan Response Surface Methodology

- Susanti EVH (2003). Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Coccus sp. 1012M15. *Jurnal Biodiversitas* 4(1): 12-17.
- Yulianti Titiek. (2013). Pemanfaatan Endofit Sebagai Agensia Pengendali Hayati Hama dan Penyakit Tanaman. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri* 5(1): 40–49.
- Yuniati R, Titania T, Nugroho, Fifi P (2015). Uji Aktivitas Enzim Protease dari isolat *Ba6illus* sp. Galur Lokal Riau. *Journal FMIPA* 1(12): 116-122.