

**ISOLASI, UJI AKTIVITAS DAN KONSENTRASI SUBSTRAT OPTIMUM
EKSTRAK ENZIM AMILASE DAN PROTEASE DARI BAKTERI
*Bacillus altitudinis***



Oleh :

**Nurhaliza Ayu Wulandari
23175289A**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2021**

**ISOLASI, UJI AKTIVITAS DAN KONSENTRASI SUBSTRAT OPTIMUM
EKSTRAK ENZIM AMILASE DAN PROTEASE DARI BAKTERI *Bacillus
altitudinis***

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
Derajat Sarjana Farmasi (S. Farm)
Program Studi S1-Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Nurhaliza Ayu Wulandari
23175289A**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2021**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**ISOLASI, UJI AKTIVITAS DAN KONSENTRASI SUBSTRAT OPTIMUM
EKSTRAK ENZIM AMILASE DAN PROTEASE DARI BAKTERI
*Bacillus altitudinis***

Oleh :

Nurhaliza Ayu Wulandari
23175289A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : Juli 2021

Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Dekan.



Prof. Dr. apt. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc

Pembimbing Utama

Dr. Ana Indrayati, M.Si

Pembimbing Pendamping

Hery Muhammad Ansory, S.Pd., M.Sc

Penguji :

1. Dr. apt. Titik Sunarni, M.Si

1.....

2. Drs. Budhi Prasetyo, Ph. D

2.....

3. Apt. Yane Dila Keswara, M.Sc

3.....

4. Dr. Ana Indrayati, M.Si

4.....

PERSEMBAHAN

الرَّحِيمَ الرَّحْمَنَ اَلِ بِسْمِ اللّٰهِ

Bacalah dengan menyebut nama Tuhanmu

Dan sesungguhnya telah Kami berikan hikmat kepada Luqman, yaitu: "Bersyukurlah kepada Allah. Dan barangsiapa yang bersyukur (kepada Allah), maka sesungguhnya ia bersyukur untuk dirinya sendiri; dan barangsiapa yang tidak bersyukur, maka sesungguhnya Allah Maha Kaya lagi Maha Terpuji"

(QS : Luqman ayat 12)

Dengan penuh rasa syukur, saya dapat menyelesaikan karya ini, dan semoga ini bisa menjadi awal keberhasilan dan kesuksesan dari masa depan saya. Oleh karena itu, saya persembahkan karya ini kepada:

1. Allah SWT terima kasih atas segala nikmat, kesabaran, dan keikhlasan yang telah engkau berikan.
2. Keluarga tercinta terutama Ibu, Bapak, Adek, Nenek yang selalu mendoakan dan selalu memberi motivasi.
3. Dr. Ana Indrayati, M.Si dan Hery Muhammad Ansory, S.Pd.,M.Sc selaku dosen pembimbing yang senantiasa membantu serta memberikan motivasi ataupun masukan sehingga tercapainya karya ini.
4. Navendra Anjani Putri sebagai tim peneliti saya yang telah membantu, memotivasi dan memberi semangat.
5. Tim Kos Arsyla Afrindy, Debi, Angel, Arum, Ana, Putri, Bela, Fera, Medita dan Widi Ayu
6. Rafie yang telah membantu, memotivasi dan meberikan semangat.
7. Semua teman-teman S1 Farmasi angkatan 2017
8. Almamater Universitas Setia Budi, Bangsa, dan Negara.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang penuh diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 07 Juli 2021

Yang membuat pernyataan



Nurhaliza Ayu Wulandari

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan kekuatan serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal yang berjudul **"ISOLASI, UJI AKTIVITAS DAN KONSENTRASI SUBSTRAT OPTIMUM EKSTRAK ENZIM AMILASE DAN PROTEASE DARI BAKTERI *Bacillus altitudinis*"**. Skripsi ini disusun sebagai hasil dari proses pembelajaran dan sebagai salah satu syarat mencapai derajat Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik secara moril maupun materiil. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan nikmat islam, iman, sehat, dan pertunjuknya disetiap langkah hidupku.
2. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
3. Apt. Prof. DR. RA. Oetari, SU., MM., M.Sc. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Universitas Setia Budi.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si. selaku pembimbing pertama saya yang telah memberikan bimbingan serta arahan.
5. Hery Muhammad Ansory, S.Pd.,M.Sc. selaku pembimbing kedua saya yang telah memberikan bimbingan serta arahan.
6. Apt. Dr. Tri Wijayanti, S.Farm., MPH. selaku pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan bimbingan serta arahan
7. Dosen penguji yang telah memberi masukan dan kesempatan dalam skripsi ini.
8. Segenap Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi, serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.
9. Kedua Orangtuaku beserta orang tersayang Rafie atas doa, dukungan, dan kasih sayangnya selama disusunnya skripsi ini.

10. Teman-teman angkatan 2017 dan teman kos Arsyla yang selalu mendukung, membantu dan memberikan semangat kepada saya.
11. Teman satu tim Navendra Anjani Putri yang telah bersama-sama menyelesaikan penelitian.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat peneliti sebutkan satu persatu.
13. *Last but not least, I wanna thank me, for believing in me, for doing all this hard work, for having no days off, for never quitting, for just being me at all times.*

Akhir kata penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna oleh karena itu, penulis menerima kritikan atau saran yang bersifat membangun. Semoga dengan terselesainya skripsi ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Surakarta, 07 Juli 2021



Nurhaliza Ayu Wulandari

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
PERSEMBAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	ix
ABSTRACT.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan Penelitian.....	2
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. <i>Bacillus altitudinis</i>	4
1. Sistematika <i>Bacillus altitudinis</i>	4
2. Karakteristik <i>Bacillus altitudinis</i>	4
B. Enzim Amilase.....	6
1. Golongan Enzim.....	7
3.1. Alfa (α) amilase.....	7
3.2. Beta (β) amilase.....	8
3.3. Glukosaamilase.....	8
2. Karakteristik enzim amilase.....	9
3. Peran enzim amilase.....	10
C. Enzim Protease.....	11
1. Karakteristik enzim protease.....	12
2. Peran enzim protease.....	14
D. Penetapan Kadar Protein.....	15

1.	Metode Bradford	15
2.	Metode <i>Lowry</i>	16
3.	Metode Biuret.....	18
E.	Pengujian Aktivitas Enzim	19
F.	Landasan Teori	20
G.	Hipotesa.....	23
BAB III METODE PENELITIAN		24
A.	Tempat Penelitian	24
B.	Populasi dan Sampel.....	24
1.	Populasi	24
2.	Sampel	24
C.	Variabel Penelitian	24
1.	Identifikasi variabel utama	24
2.	Klasifikasi variabel utama	24
3.	Definisi operasional variabel utama	25
D.	Bahan dan Alat	26
1.	Bahan.....	26
1.1.	Bahan Utama.	26
1.2.	Bahan lain-lain.	26
1.3.	Pewarnaan.	26
2.	Alat	26
E.	Jalannya Penelitian	26
1.	Sterilisasi Alat dan Bahan	27
2.	Pembuatan Media	27
2.1.	Pembuatan Media Nutrient Agar (NA).	27
2.2.	Pembuatan <i>Media Blood Agar Plate</i> (BAP).	27
3.	Peremajaan Bakteri.....	27
4.	Identifikasi bakteri <i>Bacillus altitudinis</i>	28
4.1.	Uji Morfologi.	28
4.2.	Pewarnaan Gram.	28
4.3.	Pewarnaan Spora.	28
4.4.	Uji katalase.	29
4.5.	Uji koagulase.....	29
4.6.	Uji fermentasi karbohidrat.	29
5.	Skrining aktivitas enzim secara kualitatif	30
5.1.	Amilase.....	30
5.2.	Protease.	30
6.	Ekstraksi enzim dari <i>Bacillus altitudinis</i>	30
7.	Pemurnian enzim	31
8.	Penentuan Kadar Protein dengan Metode <i>Lowry</i>	31
9.	Uji Aktivitas Enzim Secara Kuantitatif.....	32
9.1.	Amilase.....	32
9.2.	Protease.	33
F.	Analisis Data	34
G.	Skema Jalannya Penelitian	35

BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	38
1.	Peremajaan Bakteri.....	38
2.	Hasil Identifikasi Bakteri.....	38
2.1.	Uji Morfologi.	38
2.2.	Pewarnaan Gram.	40
2.3.	Pewarnaan Endospora.	41
2.4.	Uji Katalase.	42
2.5.	Uji Koagulase.....	43
2.6.	Uji Fermentasi Karbohidrat.....	43
3.	Skrining enzim secara kualitatif	44
4.	Hasil ekstraksi protein kasar dari <i>Bacillus altitudinis</i>	46
5.	Hasil pengukuran kadar ekstrak kasar protein bakteri <i>Bacillus altitudinis</i>	49
6.	Hasil Uji Aktivitas Enzim Secara Kuantitatif	49
6.1.	Hasil uji aktivitas enzim amilase.....	52
6.2.	Hasil uji aktivitas enzim protease.....	52
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	60
A.	Kesimpulan.....	60
B.	Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	74

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. <i>Bacillus altitudinis</i> (Sunar <i>et al.</i> , 2015).....	4
Gambar 2. Skema penelitian.....	35
Gambar 3. Ekstraksi enzim.....	35
Gambar 4. Uji aktivitas enzim.....	37
Gambar 5. Peremajaan bakteri.....	38
Gambar 6. Hasil identifikasi uji morfologi.....	40
Gambar 7. Hasil idetifikasi pewarnaan Gram	41
Gambar 8. Hasil pewarnaan endospora	42
Gambar 9. Hasil identifikasi uji katalase.....	43
Gambar 10. Hasil identifikasi uji koagulase.....	43
Gambar 11. Hasil identifikasi uji fermentasi karbohidrat	44
Gambar 12. Hasil skrining aktivitas amilolitik pada media <i>Starch Agar</i>	45
Gambar 13. Hasil skrining aktivitas proteolitik pada media <i>Skim Milk Agar</i> ..	46
Gambar 14. Kurva dan persamaan kalibrasi konsentrasi terhadap serapan larutan BSA	50
Gambar 15. Kurva standar glukosa	53

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil identifikasi uji morfologi dengan media BAP	39
Tabel 2. Hasil identifikasi pewarnaan Gram	40
Tabel 3. Hasil identifikasi pewarnaan endospora	41
Tabel 4. Hasil identifikasi uji katalase	42
Tabel 5. Hasil identifikasi uji koagulase	43
Tabel 6. Hasil identifikasi uji fermentasi karbohidrat.....	44
Tabel 7. Nilai absorbansi spektrofotometri UV-Vis variasi konsentrasi larutan BSA (sebagai standar).....	50
Tabel 8. Data pengukuran kadar protein ekstrak enzim bakteri <i>Bacillus altitudinis</i>	51
Tabel 9. Hasil analisis variasi konsentrasi substrat amilum terhadap ekstrak enzim amilase.....	54
Tabel 10. Hasil analisis variasi konsentrasi substrat kasein terhadap ekstrak enzim protease.....	57

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Isolat bakteri <i>Bacillus altitudinis</i> pada media NA.....	75
Lampiran 2. Starter Bakteri.....	75
Lampiran 3. Media produksi.....	75
Lampiran 4. Hasil skrining aktivitas ekstrak enzim.....	76
Lampiran 5. Hasil sentrifugasi ekstrak enzim.....	76
Lampiran 6. Hasil supernatan ekstraksi ekstrak enzim.....	76
Lampiran 7. Hasil pemurnian enzim.....	77
Lampiran 8. Reagen uji aktivitas ekstrak enzim secara kuantitatif.....	77
Lampiran 9. Alat yang digunakan untuk praktikum.....	77
Lampiran 10. Perhitungan aktivitas ekstrak enzim.....	78
Lampiran 11. Perhitungan statistik.....	80
Lampiran 12. Komposisi dan pembuatan media.....	85
Lampiran 13. Pembuatan larutan standar glukosa.....	86

INTISARI

WULANDARI, N.A. 2021. ISOLASI, UJI AKTIVITAS DAN KONSENTRASI SUBSTRAT OPTIMUM EKSTRAK ENZIM AMILASE DAN PROTEASE DARI BAKTERI *Bacillus altitudinis*, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Enzim protease dan amilase banyak digunakan dalam makanan, farmasi dan industri kimia lainnya. *Bacillus altitudinis* diketahui mampu menghasilkan enzim amilase dan protease. Faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi substrat. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengetahui aktivitas serta karakterisasi substrat sebagai penghasil enzim amilase dan protease tertinggi.

Bakteri *Bacillus altitudinis* diekstraksi setelah diketahui mampu memproduksi enzim amilase dan protease dari uji skrining aktivitas enzim secara kualitatif. Ekstrak kasar enzim diukur kadar proteinnya dengan metode *Lowry*. Pengujian aktivitas enzim amilase dilakukan dengan metode DNS pada konsentrasi substrat 1%, 1,25% dan 1,5% dan aktivitas enzim protease dengan metode *Bergmeyer* pada konsentrasi substrat 1%, 1,5% dan 2%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri *Bacillus altitudinis* memiliki aktivitas enzim amilase dan protease. Karakterisasi substrat enzim paling tinggi yaitu pada konsentrasi pati 1,5% dengan aktivitas enzim amilase sebesar 0,0449 U/mL dan konsentrasi kasein 2% sebesar 0,8538 U/mL untuk aktivitas enzim protease.

Kata Kunci : Amilase, Protease, *Bacillus altitudinis*, Konsentrasi Substrat

ABSTRACT

WULANDARI, N.A. 2021. ISOLATION, TEST ACTIVITY AND CONCENTRATION OF OPTIMUM SUBSTRATE EXTRACTS OF AMYLASE AND PROTEASE ENZYMES FROM *Bacillus altitudinis* BACTERIA, ESSAY, FACULTY OF PHARMACY OF UNIVERSITY SETIA BUDI, SURAKARTA.

Protease and amylase enzymes have been widely used in the food, pharmaceutical, and other chemical industries. *Bacillus altitudinis* is known to produce amylase and protease enzymes. The main factor affecting enzyme activity is substrate concentration. This study aims to isolate and determine the activation and characterization of the substrate as the highest producer of amylase and protease enzymes.

Bacillus altitudinis extracted after that found that it could produce amylase and protease enzymes from a qualitative screening test of enzyme activity. This crude extract of the enzyme was measured, its protein content by the Lowry method. The amylase enzyme activity testing by the DNS method at 1%, 1.25%, and 1.5% substrate concentrations and the protease enzyme activity by the Bergmeyer method at 1%, 1.5%, and 2% substrate concentrations.

The results showed that the isolates of *Bacillus altitudinis* bacteria had amylase and protease enzyme activity. The highest enzyme-substrate characterization was at 1.5% starch concentration with amylase enzyme activity of 0.0449 U/mL and 2% casein concentration of 0.8538 U/mL for protease enzyme activity.

Keyword : Amylase, Protease, *Bacillus altitudinis*, Concentrate substrate

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penggunaan enzim meningkat dari tahun ke tahun, peningkatan terjadi 10% hingga 15% (Mufarrikha *et al.*, 2014). Peningkatan enzim terjadi terutama enzim amilase dan protease. Seperti yang kita ketahui bersama, amilase dan protease memiliki prospek pengembangan yang baik karena dianggap banyak digunakan di berbagai industri pangan dan non pangan yang diperdagangkan di seluruh dunia (Risnawati dan Sari, 2013; Sawant dan Nagendran, 2014; Souza *et al.*, 2015). Menurut de Souza *et al.* (2010) enzim amilase yang dihasilkan dari mikroba dapat dimanfaatkan dalam industri tekstil, kertas, deterjen, konversi pati, dan produksi bahan bakar etanol. Sementara itu di bidang bioteknologi, enzim protease juga banyak digunakan untuk memproduksi asam amino dan peptida dari substrat bermolekul tinggi atau dalam industri kulit, digunakan dalam pengolahan air limbah, tekstil, obat-obatan, kosmetik, industri pengolahan kulit dan peternakan unggas (Uddin *et al.*, 2014).

Bakteri memiliki potensi besar untuk tumbuh dalam industri bioteknologi. Potensi ini berkaitan dengan kemampuannya seperti amilolitik, proteolitik, lipolitik, antibiotik, selulolitik dan sebagainya (Hatmanti, 2000). Bakteri yang diketahui dapat memproduksi enzim amilase dan protease yaitu bakteri dari genus *Bacillus* (Safitri *et al.*, 2018 ; Isti'annah *et al.*, 2020). Pada penelitian ini bakteri yang akan diteliti merupakan bakteri hasil isolasi dari tanah hutan mangrove Maron Edupark, Semarang Jawa Tengah dengan menunjukkan bahwa spesies bakteri tersebut adalah *Bacillus altitudinis* dengan homologi 99% (Wulandari, 2019). Menurut Wilis dan Subagiyo (2012) enzim yang dihasilkan oleh bakteri pada mangrove adalah enzim protease, amilase, selulosa dan lipase. Bakteri *Bacillus altitudinis* diketahui dapat memproduksi enzim protease dan amilase (Kumar dan Debajit, 2012 ; Vishwanatha *et al.*, 2020).

Faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, senyawa inhibitor, aktivator, pH, dan suhu lingkungan. Dalam

penelitian ini peneliti ingin melihat adanya pengaruh dari penambahan variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas ekstrak enzim amilase dan protease terhadap bakteri *Bacillus altitudinis*. Tiga konsentrasi diambil berdasarkan penelitian Istia'nah *et al* (2020) terhadap bakteri *Bacillus megaterium* dengan variasi konsentrasi substrat amilum 1%, 1,25% dan 1,5% dengan menghasilkan konsentrasi substrat optimum pada substrat amilum 1,5% sebesar 0,548 U/mL aktivitas enzim amilase dan untuk enzim protease berdasarkan penelitian Prastika (2008) terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dengan variasi konsentrasi substrat kasein 1%, 1,5% dan 2% mampu bekerja optimal dengan konsentrasi substrat 1,5% dengan waktu inkubasi 40 menit sebesar 10.998 U/ml dan konsentrasi 2% sebesar 4.017 U/mL dengan waktu inkubasi 30 menit.

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat diketahui bahwa ekstrak enzim amilase dan protease yang dihasilkan oleh bakteri memiliki konsentrasi substrat yang optimum sesuai dengan kemampuan bakteri memanfaatkan nutrisi dari substrat. Pada penelitian ini peneliti tertarik melakukan uji aktivitas dan konsentrasi substrat optimum terhadap bakteri *Bacillus altitudinis* sebab sumber isolasi yang berbeda akan mempengaruhi karakteristik (konsentrasi substrat) dari bakteri tersebut sebagai penghasil ekstrak enzim amilase dan protease yang dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pada berbagai bidang seperti industri, farmasi dan bioteknologi.

B. Perumusan Masalah

Pertama, manakah diantara ekstrak enzim amilase dan ekstrak enzim protease dari bakteri *Bacillus altitudinis* yang menghasilkan aktivitas lebih besar ?

Kedua, berapakah konsentrasi substrat yang dapat menghasilkan aktivitas optimum dalam menghasilkan ekstrak enzim amilase dan protease dari bakteri *Bacillus altitudinis* ?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, mengetahui diantara ekstrak enzim amilase dan ekstrak enzim protease dari bakteri *Bacillus altitudinis* yang menghasilkan aktivitas lebih besar.

Kedua, mengetahui konsentrasi substrat yang dapat menghasilkan aktivitas optimum dalam menghasilkan ekstrak enzim amilase dan protease dari bakteri *Bacillus altitudinis*.

D. Manfaat Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat luas yang bermanfaat bagi bidang ilmu farmasi, bidang ilmu biologi, dan bidang ilmu kesehatan lainnya mengenai enzim amilase dan protease. Menambah informasi tentang potensi bakteri penghasil ekstrak enzim amilase dan protease. Memberikan landasan ilmiah bagi penelitian selanjutnya.