

UJI AKTIVITAS ENZIM PROTEASE PADA KEDELAI GRADE C YANG DIFERMENTASI PADAT DENGAN INOKULUM TEMPE KEDIRI

Ahmad Yusron¹, Nadila Purwitasari², Hamid Abdillah³

¹⁻³Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. A. Yani Tromol Pos 1 Pabelan Kartasura 57102 Telp 0271 717417
Email: d500170057@student.ums.ac.id

Abstrak

*Kedelai grade c sering dianggap sebagai limbah pertanian dan jarang digunakan namun memiliki nilai gizi yang cukup tinggi, salah satunya adalah protein. Oleh karena itu dapat dimanfaatkan sebagai substrat dalam produksi enzim protease melalui proses fermentasi padat kedelai grade c dengan inokulum tempe Kediri. Enzim protease ini memiliki nilai ekonomis yang tinggi karena efisien dan ramah lingkungan sehingga dapat berkontribusi menjaga lingkungan dengan memanfaatkan limbah padat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh moisture content variasi MC% 85%, 80%, 75% dengan nutrisi tambahan berupa Magnesium klorida variasi 10ml, 20ml, 30ml dan juga pengaruh pH 7, 8, 9 dengan variasi waktu inkubasi 48 jam, 76 jam, 96 jam terhadap aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh enzim *Rhizopus sp.* Uji aktivitas enzim protease dilakukan secara spektrofotometri dengan kasein sebagai substratnya. Hasil pengujian aktivitas enzim protease menunjukkan nilai aktivitas yang berbeda beda. Pada kisaran variable moisture content dengan nutrisi tambahan yang dipelajari kondisi optimum aktivitas enzim protease adalah moisture content 75% dan nutrisi tambahan sebesar 30 mg, Aktivitas enzim protease yang diperoleh sebesar 2,0949 unit/mL. Dan pada kisaran variable pH dengan waktu inkubasi yang dipelajari kondisi optimum aktivitas enzim protease adalah pH 7 dan waktu inkubasi selama 96 jam, Aktivitas enzim protease yang diperoleh sebesar 1,5072 unit/ml.*

Kata kunci: enzim; fermentasi padat ; kedelai; protease; protein

PENDAHULUAN

Biokatalisator yang secara umum disebut enzim merupakan senyawa yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia karena reaksi dari biokatalisator yang menghasilkan kecepatan, spesifikasi, dan kendali pengaturan pada reaksi di dalam tubuh (1). Secara luas, Enzim yang sering digunakan dalam industri adalah enzim amilase, lipase, dan protease, Enzim ini berfungsi sebagai pemecah senyawa makromolekul karbohidrat, lemak, dan protein (2). Pemakaian enzim yang sifatnya efisien, selektif, mengkatalisis reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri (3). Enzim bisa dihasilkan dari limbah agroindustri atau pertanian yang sering dijumpai di pasar tradisional. Salah satu contohnya adalah kedelai dengan *grade c*, kedelai dengan kualitas rendah ini yang sering kali dibuang begitu saja menjadi limbah tanpa diolah terlebih dulu menjadi produk yang dapat dimanfaatkan.

Enzim protease merupakan enzim yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi dengan total penjualan mencapai 60% di seluruh dunia karena aplikasinya yang sangat luas dan dapat digunakan diberbagai jenis industri (4). Hal ini dikarenakan tingginya tingkat implementasi enzim pada berbagai bidang seperti kimia dan farmasi, makanan atau produksi energy (5). Diketahui bahwa hewan, mikroba, dan tanaman merupakan sumber enzim protease (6). Namun mikroorganisme dianggap lebih potensial sebagai penghasil enzim karena dapat tumbuh pada substrat yang murah. Selain itu dapat tumbuh dengan cepat dan hasilnya pun dapat dioptimasi (7). Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengoptimasi aktivitas enzim yang biasa digunakan adalah penambahan sumber nitrogen dan variasi *moisture content*, karena signifikan dianggap dapat mempengaruhi aktifitas enzim (8).

Salah satu proses sederhana yang dapat digunakan dalam pembentukan enzim adalah fermentasi padat yang melibatkan mikroba. Salah satu jenis mikroba yang berpotensi sebagai inokulum untuk proses fermentasi adalah kapang *Rhizopus* (9). Beberapa mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim protease diantaranya adalah bakteri genus *Bacillus* dan kapang dari genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Endothia*, *Pycrococcus*, dan *Lactobacillus* (10). Untuk melakukan proses fermentasi dari kedelai menjadi tempe diperlukan bahan yang mengandung biakan dari jamur *Rhizopus*. Bahan tersebut adalah inokulum yang berfungsi untuk merubah karakteristik dari kedelai menjadi tempe.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan penelitian mencakup botol kaca, *centrifuge*, erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, *hot plate*, *incubator*, *mesh*, neraca analitik, pipet tetes, pipet ukur, *spektrofotometer*, *stirer*, tabung reaksi, *vacuum filtration funnel* dan *waterbath*. Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari aluminium foil, *aquadest*, *buffer phosphate* pH 7, *folin ciocalteu*, inokulum tempe Kediri, kasein, kedelai kuning *grade c*, magnesium klorida, Na_2CO_3 , tirosin, TCA, dan urea.

Metode Penelitian

1. **Penyiapan bahan baku**
Kedelai *grade c* yang telah dibersihkan dan dicuci air bersih, kemudian direbus selama 30 menit sampai mendidih. Selanjutnya kedelai ditiriskan dan dikuliti sebelum direndam 36 jam. Setelah ditiriskan hingga tuntas, kedelai dikukus selama 1 jam. Kedelai yang telah dikukus, dihaluskan dan diayak hingga lolos ayakan 20 *mesh*.
2. **Produksi enzim protease variable *moisture content* dan nutrisi tambahan**
Menyiapkan 9 botol sampel yang masing masing diisi dengan 4 gram kedelai yang sudah dihaluskan dan ditambahkan *aquadest* dengan perbandingan 4:1, Kemudian ditambahkan inokulum tempe Kediri sebanyak 0,1 mg, urea 0,1 mg, nutrisi tambahan berupa magnesium klorida dengan variasi 0,1 ; 0,2 ; 0,3 mg, selanjutnya ditambah variasi yang kedua berupa penambahan *aquadest* untuk *moisture content* dengan variasi 75% ; 80% ; 85%. Menyiapkan 1 botol yang diisi sama dengan isian botol sampel tanpa penambahan variasi nutrisi dan *moisture content*. Kemudian diinkubasi pada suhu $\pm 32^\circ\text{C}$ selama 48 jam.
3. **Produksi enzim protease variable pH dan waktu inkubasi**
Menyiapkan 9 botol sampel yang masing masing diisi dengan 4 gram kedelai yang sudah dihaluskan dan ditambahkan *aquadest* dengan perbandingan 4:1, Kemudian ditambahkan inokulum tempe Kediri sebanyak 0,1 mg, urea 0,1 mg, magnesium klorida 0,1 mg, penambahan larutan pH dengan variasi pH 7, 8, 9 selanjutnya menyiapkan 1 botol yang diisi sama dengan isian botol sampel tanpa penambahan variasi pH dan juga waktu inkubasi. Kemudian diinkubasi pada suhu $\pm 32^\circ\text{C}$ sesuai dengan waktu variasi inkubasi selama 48, 72, dan 96 jam.
4. **Pengambilan enzim**
Hasil fermentasi kemudian diekstrak dengan *aquadest* kemudian dimasukkan ke *waterbath* selama 15 menit. Selanjutnya menyiapkan *vacuum filtration funnel* untuk memisahkan cairan dan endapan sampel.
5. **Uji aktivitas enzim**
Uji aktivitas protease berdasarkan metode Anson 5 ml kasein 0,65% di masukkan *waterbath* pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya kasein ditambahkan dengan 0,5 ml ekstrak protease, campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 10 menit lalu campuran ditambahkan 5 ml TCA 0,01 M untuk menghentikan reaksi. Selanjutnya supernatan dipisahkan dari endapan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh diambil 2 ml dan ditambahkan 5 ml Na_2CO_3 (0,04M). Kemudian ditambahkan 1 ml *Folin Ciocalteu* dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu 37°C . Aktivitas enzim ditetapkan dengan mengukur absorbansi produk hasil reaksi pada panjang gelombang 660 nm. Perhitungan aktivitas dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$k = \frac{U \cdot V_1}{V_2 \cdot V_3} \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Protease Kasar

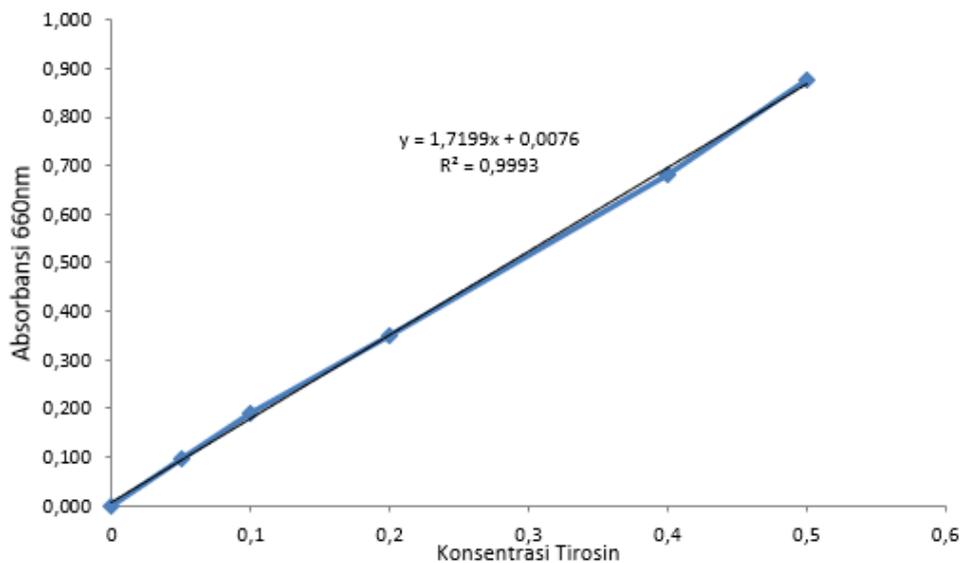
Salah Satu cara yang dapat dilakukan untuk mengukur produksi enzim adalah dengan mengukur aktivitas enzimnya. Sampel disentrifugasi hingga terbentuk dua lapisan yaitu residu dan supernatan. Lapisan supernatan dipisahkan dengan menyaring residu, selanjutnya larutan supernatant yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak protease kasar. Ciri fisik larutan supernatant yang teramat adalah larutan agak kekuningan, agak keruh, tidak kental dan tidak beku.



Gambar 1. Larutan Supernatan Kedelai grade c.

Pengujian Aktivitas Enzim Protease

Tahapan awal yang dilakukan sebelum menguji aktivitas enzim protease pada kedelai grade c dilakukan pengujian panjang gelombang maksimum larutan standar tirosin dan pembuatan kurva standar tirosin. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan standar tirosin dengan panjang gelombang 660 nm, Panjang gelombang yang memberikan absorbansi tertinggi digunakan sebagai panjang gelombang maksimum. Spektrofotometer pada penentuan panjang gelombang maksimum ditunjukkan pada lampiran A. Pada pembuatan kurva standart tirosin, konsentrasi standar divariasikan menjadi 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 nM. Persamaan regresi linier kurva standar tirosin adalah $1,7199x + 0,0076$ dengan koefisien regresi linier 0,9993.



Gambar 2. Kurva Standar Tirosin.

Substrat yang digunakan pada uji aktivitas ptotease dengan metode Anson adalah kasein 0,65%. Pengujian aktivitas protease dari sampel dilakukan dengan mereaksikan ekstrak kedelai dengan kasein di dalam inkubator dengan suhu 37°C, pH 7 selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan TCA untuk menghentikan reaksi dari kasein. Untuk mendapatkan supernatan yang mengandung tirosin maka dilakukan sentrifugasi. Kadar tirosin ditentukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu yang kemudian ditambahkan Na₂CO₃. Jumlah tirosin sampel sangat mempengaruhi besarnya aktivitas protease kedelai, semakin besar perbedaannya dengan jumlah tirosin blanko maka semakin besar pula aktivitas proteasenyanya. Berikut ini kadar tirosin yang diperoleh sebelum perhitungan dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 1. Data Absorbansi Tirosin yang Terbentuk Variable Moisture Content dan Nutrisi Tambahan.

Nutrisi tambahan	Moisture Content	Absorbansi pada 660 nm	Rata - Rata Absorbansi (A)	Tirosin yang terbentuk (nmol)
		Ulangan		

		1	2	3		
Blanko tanpa variasi		0,2211	0,2248	0,2301	0,2253	0,1266
Tanpa Variasi		0,9850	0,9870	0,9904	0,9875	0,5697
10 mg	75%	1,1480	1,1400	1,1400	1,1427	0,6600
	Blanko	0,2246	0,2274	0,2312	0,2277	0,1280
	80%	0,8160	0,8370	0,8550	0,8360	0,4817
	Blanko	0,2203	0,2245	0,2231	0,2226	0,1250
	85%	0,7720	0,7930	0,8020	0,7890	0,4543
	Blanko	0,2217	0,2209	0,2243	0,2223	0,1248
20 mg	75%	1,4290	1,4390	1,4430	1,4370	0,8311
	Blanko	0,2312	0,2350	0,2395	0,2352	0,1324
	80%	0,9430	0,9780	1,0711	0,9974	0,5755
	Blanko	0,2265	0,2284	0,2247	0,2265	0,1273
	85%	0,9203	0,9203	0,9288	0,9231	0,5323
	Blanko	0,2271	0,2227	0,2239	0,2246	0,1262
30 mg	75%	1,4940	1,5970	1,6010	1,5640	0,9049
	Blanko	0,2493	0,2530	0,2592	0,2538	0,1432
	80%	0,9690	0,9855	1,0500	1,0015	0,5779
	Blanko	0,2291	0,2231	0,2282	0,2268	0,1274
	85%	0,9341	0,9109	0,9250	0,9233	0,5324
	Blanko	0,2227	0,2246	0,2217	0,2230	0,1252

Kadar tirosin sampel jika diurutkan dari nilai yang paling besar sampai paling kecil secara berturut-turut adalah 30 mg 75% MC; 20 mg 75% MC; 10 mg 75% MC; 30 mg 80% MC; 20 mg 80% MC; 20 mg 85% MC; 30 mg 85% MC; 10 mg 80% MC; 10 mg 85% MC. Aktivitas enzim protease dapat dilihat dari tingginya kadar tirosin yang terdapat pada masing-masing sample, Semakin tinggi kadar tirosin dalam sampel maka semakin tinggi pula aktivitas protease pada sample. Setelah dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus, Data yang diperoleh dapat dilihat pada **Tabel 2** dibawah ini.

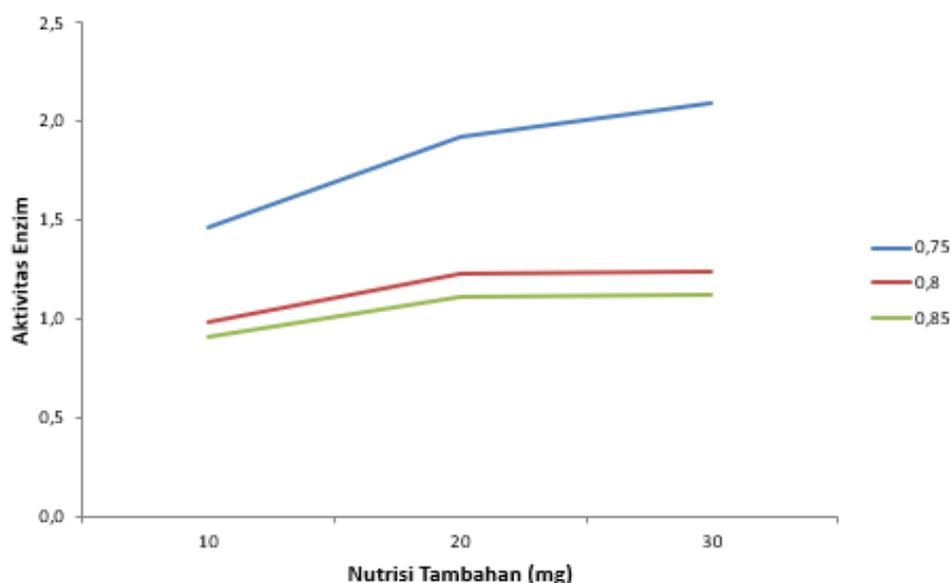
Tabel 2. Data Aktivitas Enzim Protease Setelah Perhitungan Variable *Moisture Content* dan Nutrisi Tambahan.

Nutrisi tambahan	Moisture Content	Aktivitas Enzim Protease		
		Units	k (u/ml)	k (u/mg)
Tanpa Variasi		0,0443	1,2186	81,2399
10 mg	75%	0,0532	1,4629	97,5276
	80%	0,0357	0,9807	65,3820
	85%	0,0329	0,9061	60,4076
20 mg	75%	0,0699	1,9215	128,1027
	80%	0,0448	1,2325	82,1672
	85%	0,0406	1,1170	74,4640
30 mg	75%	0,0762	2,0949	139,6577
	80%	0,0450	1,2387	82,5794
	85%	0,0407	1,1198	74,6523

Hasil pengujian aktivitas enzim protease kedelai *grade c* pada **Tabel 2** di atas menunjukkan bahwa variasi moisture content dan nutrisi tambahan yang diberikan menghasilkan aktivitas enzim protease besarnya berturut turut 1,2186; 1,4629; 0,9807; 0,9061; 1,9125; 1,2325; 1,1170; 2,0949; 1,2387; 1,1198. Bila diurutkan aktivitas pada variasi *moisture content* 75% dan nutrisi tambahan sebanyak 30 mg memiliki aktivitas tertinggi pada pengujian. Berikut ini pengaruh perubahan hasil uji aktivitas enzim protease pada kedelai *grade c*:

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease Variable *Moisture Content* dan Nutrisi Tambahan.

Nutrisi Tambahan (mg)	<i>Moisture Content</i> (%)		
	0,75	0,8	0,85
10	1,4629	0,9807	0,9061
20	1,9215	1,2325	1,1170
30	2,0949	1,2387	1,1198



Gambar 3. Grafik Hubungan Aktivitas Enzim dengan Nutrisi Tambahan dan *Moisture Content*.

Pada Gambar 3 menunjukkan aktivitas enzim protease paling tinggi ada pada *moisture content* 75%. Hal ini disebabkan pada *moisture content* 75% porositas pada media lebih tinggi sehingga *transfer* oksigen yang dibutuhkan enzim dapat maksimal. Pada *moisture content* 80% dan 85% porositas media enzim semakin menurun sehingga *transfer* oksigen menjadi kurang maksimal. Namun pada *moisture content* yang tinggi, kelarutan nutrisi yang terkandung dalam media juga semakin tinggi sehingga dapat memenuhi kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan enzim protease untuk tumbuh. Jika *moisture content* nya yang terlalu rendah maka kelarutan nutrisi pada media enzim akan berkurang. Sedangkan jika *moisture content* terlalu tinggi akan menyebabkan porositas pada media enzim semakin kecil sehingga menghalangi *transfer* oksigen yang diperlukan (11).

Pada percobaan ini dapat dilihat bahwa aktivitas enzim paling tinggi ada pada kondisi *moisture content* sebesar 75% dengan

Tabel 4. Data Absorbansi Tirosin yang Terbentuk Variable *pH* dan Waktu Inkubasi.

Waktu Fermentasi	pH	Absorbansi pada 660 nm			Rata - Rata Absorbansi (A)	Tirosin yang terbentuk (nmol)
		Ulangan				
		1	2	3		
Blanko tanpa variasi		0,2211	0,2248	0,2301	0,2253	0,1266
Tanpa Variasi		0,9850	0,9870	0,9904	0,9875	0,5697
48 jam	7	0,9400	0,9420	0,9430	0,9417	0,5431
	Blanko	0,2217	0,2219	0,2240	0,2225	0,1250

	8	0,8980	0,8980	0,8980	0,8980	0,5177
	Blanko	0,2234	0,2234	0,2234	0,2234	0,1255
	9	0,8960	0,8959	0,8969	0,8960	0,5165
	Blanko	0,2244	0,2272	0,2313	0,2276	0,1279
72 jam	7	0,9470	0,9448	0,9948	0,9622	0,5550
	Blanko	0,2316	0,2352	0,2398	0,2355	0,1325
	8	0,9470	0,9470	0,9460	0,9467	0,5460
	Blanko	0,2267	0,2286	0,2248	0,2267	0,1274
	9	0,8430	0,8432	0,8430	0,8431	0,4858
	Blanko	0,2274	0,223	0,224	0,2248	0,1263
96 jam	7	1,4320	1,4310	1,4340	1,4323	0,8284
	Blanko	0,2495	0,2532	0,2595	0,2541	0,1433
	8	0,9450	0,9440	0,9420	0,9437	0,5443
	Blanko	0,2293	0,2233	0,2284	0,2270	0,1276
	9	0,8390	0,8390	0,8430	0,8403	0,4842
	Blanko	0,2227	0,2246	0,2217	0,2230	0,1252

Kadar tirosin sampel jika diurutkan dari nilai yang paling besar sampai paling kecil secara berturut-turut adalah pH 7 inkubasi 96 jam; pH 7 inkubasi 72 jam; pH 8 inkubasi 96 jam; pH 8 inkubasi 72 jam; pH 7 inkubasi 48 jam; pH 8 inkubasi 48 jam; pH 9 inkubasi 48 jam; pH 9 inkubasi 72 jam; pH 9 inkubasi 96 jam. Aktivitas enzim protease dapat dilihat dari tingginya kadar tirosin yang terdapat pada masing-masing sample, Semakin tinggi kadar tirosin dalam sampel maka semakin tinggi pula aktivitas protease pada sample. Setelah dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus, Data yang diperoleh dapat dilihat pada **Tabel 5** dibawah ini

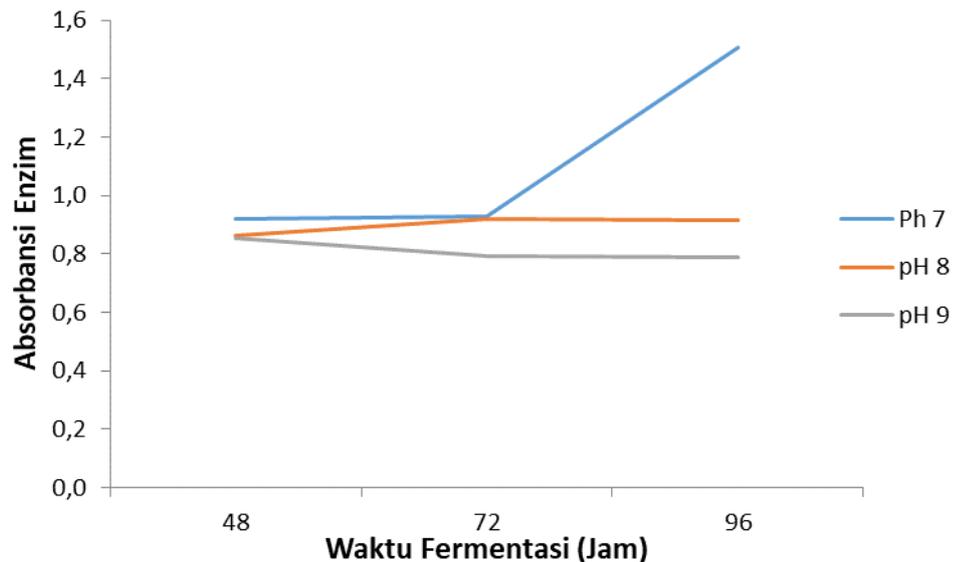
Tabel 5. Data Aktivitas Enzim Protease Setelah Perhitungan Variable pH dan Waktu Inkubasi.

Waktu Fermentasi	Ph	Aktivitas Enzim Protease		
		Units	k (u/ml)	k (u/mg)
Tanpa Variasi		0,0443	0,9749	64,9919
48 jam	7	0,0418	0,9199	61,3250
	8	0,0392	0,8629	57,5274
	9	0,0389	0,8549	56,9916
72 jam	7	0,0423	0,9295	61,9674
	8	0,0419	0,9209	61,3961
	9	0,0359	0,7909	52,7235
96 jam	7	0,0685	1,5072	100,4782
	8	0,0417	0,9167	61,1147
	9	0,0359	0,7897	52,6439

Hasil pengujian aktivitas enzim protease kedelai *grade c* pada **Tabel 5** di atas menunjukkan bahwa variasi pH dan variasi waktu inkubasi menghasilkan aktivitas protease terbesar pada kondisi waktu fermentasi selama 96 jam dalam kondisi pH 7 dengan nilai aktivitas protease sebesar 100,4782 u/mg. Lebih lengkapnya hasil uji aktivitas enzim protease dapat dilihat pada **Tabel 6** berikut:

Tabel 6. Data Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease Variable pH dan Waktu Inkubasi.

Waktu Fermentasi (jam)	pH		
	7	8	9
48	0,9199	0,8629	0,8549
72	0,9295	0,9209	0,7909
96	1,5072	0,9167	0,7897

**Gambar 4.** Grafik Hubungan Aktivitas Enzim dengan pH dan Waktu Inkubasi.

Pada gambar 4 diatas bahwa aktivitas protease paling tinggi dengan pH dan variasi waktu inkubasi yaitu saat kondisi pH 7 dan pada 96 jam fermentasi. Karakteristik aktivitas proteolitik dari inokulum tempe Kediri dengan substrat kedelai *grade c* pada waktu fermentasi 72 jam dengan berbagai variasi pH mengalami kenaikan. Pada pH 7 aktivitas protease mengalami kenaikan seiring dengan lamanya fermentasi, akan tetapi pada kondisi pH 8 dan pH 9 aktivitas protease mengalami penurunan dikarenakan kondisi basa yang dapat menghambat perkembangbiakan inokulum tempe Kediri. pH dapat mempengaruhi sisi aktif pada asam amino dan dapat mengalami denaturasi (12). Proses fermentasi kedelai terjadi aktivitas enzim proteolitik yang diproduksi oleh kapang *Rhizopus Sp.* Aktivitas Protease berkaitan erat dengan proses hidrolisis protein menjadi asam amino, namun jika proses fermentasi dibiarkan secara terus menerus maka substrat protein akan habis dan terjadi pembentukan amonia yang mempunyai aroma yang sangat tajam. Pada penelitian sebelumnya oleh Nur fitriana dengan substrat kedelai didapatkan waktu fermentasi terbaik pada 24 jam. Perbedaan waktu optimum fermentasi bisa disebabkan oleh faktor lingkungan seperti kondisi pH, kadar protease dan suhu (13).

Pada percobaan ini dapat dilihat bahwa aktivitas enzim paling tinggi ada pada kondisi *moisture content* sebesar 75% dengan nutrisi tambahan sebesar 30 mg dan aktivitas enzim protease ada pada *moisture content* 85% dengan nutrisi tambahan sebesar 30 mg. Ditinjau dari pengaruh variable *moisture content* dan nutrisi tambahan terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan tampak terdapat korelasi. Pada penambahan *moisture content* dan nutrisi tambahan yang cukup, aktivitas enzim terukur tinggi. Sedangkan pada kondisi sebaliknya *moisture content* yang terlalu tinggi atau terlalu rendah juga nutrisi tambahan yang tidak mencukupi kebutuhan enzim terlihat adanya penurunan aktivitas enzim protease.

Hal ini menunjukkan bahwa variasi *moisture content* 75% dan nutrisi tambahan sebanyak 30 mg dan juga variasi pH 7 dan waktu inkubasi selama 96 jam dapat digunakan pada kedelai *grade c* agar memiliki tingkat aktivitas protease yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk pakan ternak serta mengurangi limbah dan biaya pakan pada peternakan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim tertinggi sebesar 2,0949 unit/mL diperoleh pada kondisi lingkungan yang optimum serta nutrisi tambahan yang cukup. Aktivitas enzim paling optimum pada penelitian ini diperoleh pada variable *moisture content* 75% dan nutrisi tambahan sebanyak 30 mg.

Moisture content yang terlalu tinggi dapat menyebabkan porositas media enzim semakin menurun sehingga *transfer* oksigen pada enzim menjadi kurang maksimal menyebabkan adanya penurunan aktivitas enzim protease. Nutrisi tambahan yang terlalu rendah tidak dapat mencukupi kebutuhan enzim sehingga menyebabkan adanya penurunan aktivitas enzim protease.

Pada variable pH dan juga waktu inkubasi dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim tertinggi sebesar unit/ml diperoleh pada kondisi lingkungan yang optimum serta nutrisi yang cukup. Aktivitas enzim paling optimum pada penelitian ini diperoleh pada variable pH 7 dan waktu inkubasi selama 96 jam. Derajat keasaman (pH) yang terlalu basa dapat menyebabkan deaktivasi enzim protease dan dapat menjadikan enzim rusak. Waktu inkubasi juga mempengaruhi energi aktivasi yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Asnani A, Lestari P. Aktivitas Amilase, Lipase Dan Protease Dari Cacing *Peryonix excavatus*. Molekul. 2009;4(2).
2. Kim W, Bae S, Park K, Lee S, Choi Y, Han S, et al. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). J Asia Pac Entomol. 2011;14(1).
3. Choliq A. Aktivitas Enzim Protease Dari *Mucor javanicus* yang Ditumbuhkan Pada Media Tepung Singkong {*Mannihot utilissima*} [The Activity of Protease Enzyme from *Mucor javanicus* Grow in Cassava Flour Media]. Berila Biol. 2008;9(3):299–303.
4. Yuniati R, Nugroho TT, Puspita F. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. Jom Fmipa. 2015;1(2):116–22.
5. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. Chem Soc Rev. 2013;42(15).
6. Kasmiyati S. Seleksi dan Karakterisasi Enzim Protease dari Getah Tumbuhan *Arthocarpus* spp . 2010;
7. Said MI, Likadja JC. Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi sebagai Penghasil Enzim Protease pada Industri Penyamakan Kulit PT.Adhi Satria abadi (ASA), Yogyakarta. J Ilmu dan Teknol Perten. 2012;2(9).
8. Jia J, Yang X, Wu Z, Zhang Q, Lin Z, Guo H, et al. Optimization of fermentation medium for extracellular lipase production from *Aspergillus Niger* using response surface methodology. Biomed Res Int. 2015;2015.
9. Yosi F, Sandi S, Sahara E. Analisis Sifat Fisik Bekatul dan Ekstrak Minyak Bekatul Hasil Fermentasi *Rhizopus* sp. dengan Menggunakan Inokulum Tempe. J Peternak Sriwij. 2014;3(1).
10. Sumardi S, Farisi S, Ekowati CN, Diana MS. Aktivitas dan karakterisasi enzim protease isolat *Bacillus* sp. (uj132) secara kualitatif dan kuantitatif. J Ris Akuakultur. 2019;14(3).
11. Alam MZ, Muhammad N, Mahmat ME. Production of Cellulase from Oil Palm Biomass as Substrate by Solid State Bioconversion. Am J Appl Sci. 2005;2(2).
12. Phieter AC, Chrisnasari R, Pantjajani T. Karakterisasi Enzim Pemecah Pati dari Malt Serelia. KELUWIH J Sains dan Teknol. 2020;1(1).
13. Fitriana N, Asri MT. Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max* L .) di Trenggalek. Lentera Bio. 2021;11:144–52.