

**BAB IV**  
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**4.1. Hasil**

**4.1.1. Konfirmasi Aktivitas Ekstraseluler dengan Uji Difusi**

Hasil konfirmasi aktivitas ekstraseluler dilakukan dengan uji difusi tertera pada tabel 4.1. sebagai berikut:

**Tabel 4.1.** Hasil uji aktivitas ekstaseluler

Isolat	Zona hidrolisis (cm)		
	Proteolitik	Lipolitik	Selulolitik
TA.1	0.73 ± 0.05 <sup>a</sup>	-	-
TA.3	-	1.88 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.07 <sup>a</sup>
TA.8	1.55 ± 0.11 <sup>be</sup>	3.70 ± 0.03 <sup>e</sup>	-
TA.9	0.99 ± 0.19 <sup>ab</sup>	-	-
TA.12	-	2.90 ± 0.23 <sup>d</sup>	-
TA.13	-	2.59 ± 0.13 <sup>cd</sup>	-
TA.14	1.66 ± 0.13 <sup>e</sup>	-	2.36 ± 0.09 <sup>b</sup>
TA.15	0.97 ± 0.10 <sup>ab</sup>	2.86 ± 0.12 <sup>d</sup>	3.41 ± 0.03 <sup>c</sup>
TA.16	1.14 ± 0.08 <sup>bc</sup>	2.37 ± 0.10 <sup>bc</sup>	-
TA.18	1.36 ± 0.07 <sup>cd</sup>	-	2.13 ± 0.04 <sup>a</sup>
TA.20	-	2.60 ± 0.21 <sup>cd</sup>	-
TA.22	-	2.80 ± 0.03 <sup>d</sup>	-
TA.25	0.91 ± 0.01 <sup>ab</sup>	2.12 ± 0.04 <sup>ab</sup>	-
TA.26	-	2.05 ± 0.08 <sup>ab</sup>	-

Ket: TA: Teluk Awur

#### 4.1.2. Sumber C dan N

##### 4.1.2.1. Pemilihan Sumber C Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur

Hasil pertumbuhan bakteri pada kultur pemilihan sumber C menggunakan glukosa, fruktosa, molase masing-masing 1% dapat dilihat pada tabel 4.2. sebagai berikut:

**Tabel 4.2.** Hasil pertumbuhan bakteri pada kultur pemilihan sumber C

Isolat	Perlakuan	Regresi		Pertumbuhan		
		Persamaan	R <sup>2</sup>	G	Tg	Kc
TA.8	Kontrol (-)	$y = 0.0104x + 0.0363$	0.9503	$3.28 \pm 0.27^a$	$12.82 \pm 1.03^c$	$0.05 \pm 0.004^a$
	Glukosa	$y = 0.0382x - 0.075$	0.9451	$5.00 \pm 0.06^b$	$7.18 \pm 0.09^a$	$0.09 \pm 0.001^c$
	Fruktosa	$y = 0.0352x - 0.0103$	0.9313	$4.86 \pm 0.15^b$	$7.39 \pm 0.23^a$	$0.09 \pm 0.002^c$
	Molase	$y = 0.0307x - 0.0318$	0.9441	$4.60 \pm 0.15^b$	$9.12 \pm 0.30^b$	$0.07 \pm 0.002^b$
TA.14	Kontrol (-)	$y = 0.0143x + 0.0207$	0.9552	$3.81 \pm 0.30^a$	$11.04 \pm 0.85^b$	$0.06 \pm 0.005^a$
	Glukosa	$y = 0.028x + 0.0703$	0.935	$4.41 \pm 0.05^b$	$8.15 \pm 0.10^a$	$0.08 \pm 0.001^c$
	Fruktosa	$y = 0.0264x + 0.018$	0.949	$4.55 \pm 0.09^b$	$9.23 \pm 0.19^a$	$0.07 \pm 0.001^b$
	Molase	$y = 0.022x + 0.0421$	0.9661	$4.30 \pm 0.13^b$	$8.37 \pm 0.26^a$	$0.08 \pm 0.002^{bc}$
TA.15	Kontrol (-)	$y = 0.0114x + 0.0298$	0.9396	$3.35 \pm 0.24^a$	$12.56 \pm 0.87^c$	$0.05 \pm 0.004^a$
	Glukosa	$y = 0.0296x - 0.0223$	0.9607	$4.70 \pm 0.15^c$	$8.92 \pm 0.28^a$	$0.07 \pm 0.002^c$
	Fruktosa	$y = 0.017x + 0.0021$	0.9222	$4.05 \pm 0.11^b$	$10.35 \pm 0.30^b$	$0.06 \pm 0.001^b$
	Molase	$y = 0.0153x - 0.0055$	0.913	$3.81 \pm 0.06^b$	$11.00 \pm 0.18^b$	$0.06 \pm 0.001^b$

##### 4.1.2.2. Pemilihan Sumber N Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur

Hasil pertumbuhan bakteri pada kultur pemilihan sumber N menggunakan amonium klorida, amonium nitrat, dan urea masing-masing 1% dapat dilihat pada tabel 4.3. sebagai berikut:

**Tabel 4.3.** Hasil pertumbuhan bakteri pada kultur pemilihan sumber N

Isolat	Perlakuan	Regresi		Pertumbuhan		
		Persamaan	R <sup>2</sup>	G	Tg	Kc
TA.8	Kontrol (-)	$y = 0.0104x + 0.0363$	0.9503	$3.289 \pm 0.278^a$	$12.820 \pm 1.038^c$	$0.054 \pm 0.004^a$
	Amonium Clorida	$y = 0.0215x + 0.0734$	0.9558	$4.523 \pm 0.073^c$	$9.286 \pm 0.151^{ab}$	$0.074 \pm 0.001^c$
	Amonium Nitrat	$y = 0.0221x - 0.0804$	0.8979	$4.819 \pm 0.121^c$	$8.718 \pm 0.223^a$	$0.079 \pm 0.002^c$
	Urea	$y = 0.0168x - 0.0161$	0.8895	$3.988 \pm 0.066^b$	$10.530 \pm 0.178^b$	$0.065 \pm 0.001^b$
TA.14	Kontrol (-)	$y = 0.0152x + 0.0124$	0.9181	$3.818 \pm 0.305^a$	$11.040 \pm 0.859^c$	$0.063 \pm 0.005^a$
	Amonium Clorida	$y = 0.0193x + 0.018$	0.9233	$4.239 \pm 0.084^a$	$8.494 \pm 0.17^a$	$0.081 \pm 0.001^b$
	Amonium Nitrat	$y = 0.0234x + 0.1015$	0.947	$4.786 \pm 0.067^b$	$8.776 \pm 0.125^{ab}$	$0.078 \pm 0.001^b$
	Urea	$y = 0.0213x - 0.0278$	0.9033	$4.262 \pm 0.131^a$	$9.859 \pm 0.309^{bc}$	$0.070 \pm 0.002^a$
TA.15	Kontrol (-)	$y = 0.0116x + 0.0347$	0.9216	$3.353 \pm 0.242^a$	$12.560 \pm 0.874^c$	$0.055 \pm 0.004^a$
	Amonium Clorida	$y = 0.015x + 0.0674$	0.9294	$3.942 \pm 0.108^b$	$10.650 \pm 0.298^b$	$0.065 \pm 0.001^b$
	Amonium Nitrat	$y = 0.0192x + 0.0325$	0.9424	$3.624 \pm 0.119^{ab}$	$8.282 \pm 0.273^a$	$0.083 \pm 0.002^c$
	Urea	$y = 0.0256x + 0.0339$	0.9661	$5.026 \pm 0.121^c$	$8.359 \pm 0.204^a$	$0.082 \pm 0.002^c$

### 4.1.3. Optimalisasi Konsentrasi Sumber C dan N

#### 4.1.3.1. Konsentrasi Sumber C Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur

Pertumbuhan bakteri pada kultur konsentrasi glukosa sebagai sumber C terbaik, dengan perbandingan 0,5%, 1,5%, dan 2,5% tertera pada tabel 4.4. sebagai berikut:

**Tabel 4.4.** Hasil pertumbuhan bakteri pada kultur konsentrasi sumber C

Isolat	Perlakuan	Regresi			Pertumbuhan		
		Persamaan	R <sup>2</sup>	G	Tg	Kc	
TA.8	Glukosa 0,5%	$y = 0.0177x + 0.1264$	0.8947	$3.968 \pm 0.291^b$	$10.62 \pm 0.75^b$	$0.065 \pm 0.004^a$	
	Glukosa 1,5%	$y = 0.0134x + 0.1003$	0.9173	$3.45 \pm 0.117^a$	$10.44 \pm 0.362^b$	$0.066 \pm 0.002^b$	
	Glukosa 2,5%	$y = 0.0218x + 0.082$	0.9236	$3.983 \pm 0.077^b$	$9.039 \pm 0.178^a$	$0.076 \pm 0.001^c$	
TA.14	Glukosa 0,5%	$y = 0.0208x - 0.0203$	0.945	$4.359 \pm 0.199^b$	$9.647 \pm 0.435^b$	$0.071 \pm 0.003^a$	
	Glukosa 1,5%	$y = 0.0268x + 0.0339$	0.9006	$3.897 \pm 0.069^a$	$7.699 \pm 0.138^a$	$0.09 \pm 0.001^b$	
	Glukosa 2,5%	$y = 0.0212x + 0.1079$	0.950	$4.044 \pm 0.133^{ab}$	$8.907 \pm 0.299^b$	$0.077 \pm 0.002^a$	
TA.15	Glukosa 0,5%	$y = 0.0163x + 0.1597$	0.9046	$3.93 \pm 0.284^a$	$10.72 \pm 0.747^b$	$0.064 \pm 0.004^a$	
	Glukosa 1,5%	$y = 0.0204x + 0.0231$	0.9353	$3.717 \pm 0.092^a$	$8.074 \pm 0.204^a$	$0.085 \pm 0.002^b$	
	Glukosa 2,5%	$y = 0.0168x + 0.1338$	0.9141	$3.689 \pm 0.068^a$	$9.759 \pm 0.184^b$	$0.071 \pm 0.001^a$	

#### 4.1.3.2. Konsentrasi Sumber N Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur

Pertumbuhan bakteri pada kultur konsentrasi amonium nitrat sebagai sumber N terbaik dengan perbandingan 0,05%, 0,15%, dan 0,25% tertera pada tabel 4.5. sebagaimana berikut:

**Tabel 4.5.** Hasil pertumbuhan bakteri pada kultur konsentrasi sumber N

Isolat	Perlakuan	Regresi			Pertumbuhan		
		Persamaan	R <sup>2</sup>	G	Tg	Kc	
TA.8	Amonium Nitrat 0,05 %	$y = 0.0177x + 0.0954$	0.9327	$4.348 \pm 0.293^b$	$9.686 \pm 0.631^b$	$0.071 \pm 0.004^a$	
	Amonium Nitrat 0,15 %	$y = 0.0264x + 0.1046$	0.9231	$4.963 \pm 0.061^b$	$8.463 \pm 0.105^a$	$0.081 \pm 0.001^b$	
	Amonium Nitrat 0,25 %	$y = 0.0199x + 0.1095$	0.9813	$4.486 \pm 0.063^a$	$9.362 \pm 0.133^{ab}$	$0.074 \pm 0.001^a$	
TA.14	Amonium Nitrat 0,05 %	$y = 0.0064x + 0.0617$	0.9499	$3.201 \pm 0.330^a$	$13.210 \pm 1.316^b$	$0.052 \pm 0.005^a$	
	Amonium Nitrat 0,15 %	$y = 0.0225x + 0.1019$	0.9452	$4.886 \pm 0.133^c$	$8.599 \pm 0.238^a$	$0.080 \pm 0.002^c$	
	Amonium Nitrat 0,25 %	$y = 0.0135x + 0.1336$	0.8776	$4.079 \pm 0.112^b$	$10.290 \pm 0.287^a$	$0.067 \pm 0.001^b$	
TA.15	Amonium Nitrat 0,05 %	$y = 0.0234x + 0.0344$	0.9701	$4.455 \pm 0.065^a$	$9.427 \pm 0.137^b$	$0.073 \pm 0.001^a$	
	Amonium Nitrat 0,15 %	$y = 0.0189x + 0.1306$	0.9327	$4.165 \pm 0.081^a$	$5.763 \pm 0.112^a$	$0.120 \pm 0.002^b$	
	Amonium Nitrat 0,25 %	$y = 0.018x + 0.1118$	0.9273	$4.358 \pm 0.162^a$	$9.644 \pm 0.358^b$	$0.071 \pm 0.002^a$	

#### 4.1.4. Kombinasi Pengkayaan Media

Pertumbuhan bakteri pada kultur kombinasi glukosa dan amonium nitrat sebagai sumber C dan N terbaik dengan konsentrasi yang tepat, tertera pada tabel 4.6. sebagaimana berikut:

**Tabel 4.6.** Hasil pertumbuhan bakteri kombinasi sumber C dan N optimal

Isolat	Regresi		Pertumbuhan		
	Persamaan	R <sup>2</sup>	G	Tg	Kc
TA.8	$y = 0.0207x + 0.002$	0.9309	$4.085 \pm 0.039^a$	$8.812 \pm 0.085^c$	$0.078 \pm 0.001^a$
TA.14	$y = 0.0225x - 0.0101$	0.9275	$4.314 \pm 0.044^b$	$8.344 \pm 0.084^b$	$0.083 \pm 0.001^b$
TA.15	$y = 0.0253x + 0.066$	0.9695	$4.508 \pm 0.068^c$	$7.986 \pm 0.120^a$	$0.086 \pm 0.001^c$

#### 4.1.5. Aktivitas Protease

Analisa kadar protein, total protein, aktivitas protease, dan total aktivitas protease dari ketiga isolat bakteri yang telah dilakukan kultur kombinasi sumber C dan N terbaik dengan konsentrasi tepat, tertera pada tabel 4.7. sebagai berikut:

**Tabel 4.7.** Hasil kadar protein dan aktivitas protease isolat bakteri kombinasi sumber C dan N optimal

Isolat	Kadar Protein	Total Protein	Aktivitas Protease	Total Aktivitas Protease
TA.8	$0.014 \pm 0.0001^c$	$0.014 \pm 0.0001^c$	$1.632 \pm 0.069^a$	$816 \pm 34^a$
TA.14	$0.013 \pm 0.0007^b$	$0.013 \pm 0.0007^b$	$2.864 \pm 0.125^b$	$1432 \pm 62^b$
TA.15	$0.012 \pm 0.0006^a$	$0.012 \pm 0.0006^a$	$3.253 \pm 0.022^c$	$1626 \pm 11^c$

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1. Uji Difusi Konfirmasi Aktivitas Protease

Hasil penelitian pada tabel 4.1. menunjukkan bahwa 14 isolat bakteri simbiosis memiliki aktivitas proteolitik, lipolitik dan selulolitik. Aktivitas proteolitik adalah aktivitas mengkatalisis proteinase dengan hidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih sederhana, atau peptidase yang menghidrolisis fragmen polipeptida menjadi asam amino. Sedangkan, enzim proteolitik yang berasal dari mikroorganisme mengandung proteinase dan peptidase (Ferdiansyah, 2005). Pengertian dari lipolitik adalah enzim yang bekerja untuk menghidrolisis lemak maupun minyak menjadi asam lemak dan gliserol yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Aktivitas lipolitik ini



dapat memecah ikatan ester pada lemak sehingga menjadi asam lemak dan gliserol (Poedjiadi, 2007). Aktivitas selulolitik merupakan aktivitas yang dapat menghidrolisis selulosa kompleks menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya dipecah lagi menjadi glukosa. Glukosa tersebut digunakan kembali menjadi sumber nutrisi karbon bagi pertumbuhan organisme ini (Ibrahim dan El-diwany, 2007). Konfirmasi aktivitas proteolitik tersebut dilakukan dengan uji difusi agar menggunakan paper disk 0,8 cm. Adanya aktivitas proteolitik, lipolitik, dan selulolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening mengelilingi paper disk sebagai bentuk pemecahan senyawa proteolitik, lipolitik, maupun selulolitik. Zona bening yang telah dilakukan pengukuran dapat dilihat pada tabel 4.1.

Hasil uji difusi dari ke-14 isolat tersebut terdapat 8 isolat yang memiliki aktivitas proteolitik yaitu isolat TA. 1, TA.8, TA.9, TA.14, TA.15, TA.16, TA.18, TA.25. terdapat sepuluh isolat beraktivitas lipolitik yaitu TA.3, TA.8, TA.12, TA.13, TA.15, TA.16, TA.20, TA.22, TA.25, TA.26, dan 4 isolat beraktivitas selulolitik yaitu TA.3, TA.14, TA.15, TA.18. Diantara ke-14 isolat tersebut, terdapat 7 isolat yang dapat melakukan multiaktivitas hidrolisis, diantaranya TA.3 dapat melakukan hidrolisis lipolitik beserta selulolitik, TA.8 bermultiaktivitas proteolitik beserta lipolitik, TA.14 bermultiaktivitas proteolitik beserta selulolitik, TA.16 multiaktivitas proteolitik beserta lipolitik, TA.18 multiaktivitas proteolitik beserta selulolitik, TA.25 multiaktivitas proteolitik beserta lipolitik, dan TA.15 yang dapat melakukan 3 hidrolisis sekaligus yaitu proteolitik, lipolitik, maupun selulolitik. Selanjutnya, dipilih 3 isolat terbaik berdasarkan nilai proteolitik tertinggi dan memiliki multiaktivitas hidrolisis, yaitu TA.8, TA.14, TA.15.

Isolat TA.8 dipilih karena multiaktivitas proteolitik dan lipolitik yang dihasilkan berbeda nyata dengan isolat-isolat lainnya. Multiaktivitas proteolitik dan selulolitik isolat TA.14 juga berbeda nyata dengan isolat-isolat lain, bahkan aktivitas proteolitik yang dihasilkan bernilai paling tinggi dibanding 14 isolat lain. Isolat TA.15 dipilih karena memiliki multiaktivitas proteolitik, lipolitik, dan selulolitik yang berbeda nyata dengan ke-14 isolat lainnya.

## 4.2.2. Sumber C dan N

### 4.2.2.1. Pemilihan Sumber C Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur

Hasil isolat bakteri yang telah didapatkan, selanjutnya dilakukan pemilihan sumber C. Sumber C yang digunakan antara lain glukosa, fruktosa, dan molase. Data hasil seleksi sumber C dapat dilihat pada tabel 4.2. yang menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan sumber C berpengaruh terhadap jumlah generasi, waktu generasi, dan kecepatan pertumbuhan isolat TA.8, TA.14, TA.15. Sumber C terpilih berdasarkan kecepatan generasi tertinggi.

Tabel 4.2. memperlihatkan bahwa isolat TA.8 memiliki jumlah generasi terbaik pada perlakuan glukosa yaitu  $5,00 \pm 0,06$  berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (-) yang sebesar  $3,28 \pm 0,27$  namun, tidak berbeda nyata terhadap fruktosa sebesar  $4,86 \pm 0,15$  maupun molase sebesar  $4,60 \pm 0,15$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada perlakuan kontrol dengan nilai  $12,82 \pm 1,03$  berbeda nyata dengan perlakuan molase  $9,12 \pm 0,30$  berbeda nyata pula dengan perlakuan fruktosa yang bernilai  $7,39 \pm 0,23$ , dan perlakuan glukosa yang hanya  $7,18 \pm 0,09$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada perlakuan glukosa yaitu  $0,96 \pm 0,001$  meskipun tidak berbeda nyata terhadap fruktosa yang sebesar  $0,93 \pm 0,002$ . Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.8 memiliki pertumbuhan terbaik pada perlakuan glukosa.

Tabel 4.2. menunjukkan pula bahwa pada isolat TA.14 memiliki jumlah generasi terbaik pada perlakuan fruktosa yaitu  $4,55 \pm 0,09$  berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (-) yang hanya sebesar  $3,81 \pm 0,30$  namun, tidak berbeda nyata terhadap glukosa sebesar  $4,41 \pm 0,05$  maupun molase sebesar  $4,30 \pm 0,13$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada perlakuan kontrol (-) dengan nilai  $11,04 \pm 0,85$  berbeda nyata dengan perlakuan molase  $8,37 \pm 0,26$  berbeda nyata pula dengan perlakuan fruktosa yang bernilai  $9,23 \pm 0,19$ , dan perlakuan glukosa yang hanya  $8,15 \pm 0,10$ . Kecepatan generasi terbaik justru ada pada perlakuan glukosa yaitu sebesar  $0,84 \pm 0,001$  meskipun tidak berbeda nyata terhadap fruktosa yang sebesar  $0,82 \pm 0,002$ . Berdasarkan hasil kecepatan generasi terbaik inilah menunjukkan bahwa isolat TA.14 memiliki pertumbuhan terbaik pada perlakuan glukosa.

Tabel 4.2. menunjukkan bahwa pada isolat TA.15 memiliki jumlah generasi terbaik pada perlakuan glukosa yaitu  $4,70 \pm 0,15$  berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (-) yang hanya sebesar  $3,35 \pm 0,24$ , berbeda nyata pula terhadap fruktosa sebesar  $4,05 \pm 0,11$  maupun molase sebesar  $3,81 \pm 0,06$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada perlakuan kontrol (-) dengan nilai  $12,56 \pm 0,87$  berbeda nyata dengan perlakuan molase  $11,00 \pm 0,18$  berbeda nyata pula dengan perlakuan fruktosa yang bernilai  $10,35 \pm 0,30$  dan perlakuan glukosa yang hanya  $8,92 \pm 0,28$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada perlakuan glukosa yaitu sebesar  $0,77 \pm 0,002$  berbeda nyata terhadap fruktosa yang sebesar  $0,66 \pm 0,001$  berbeda nyata pula dengan molase yaitu  $0,62 \pm 0,001$  dan jauh berbeda nyata dengan kontrol (-) yang hanya sebesar  $0,55 \pm 0,004$ . Berdasarkan pengamatan inilah menunjukan bahwa isolat TA.14 memiliki pertumbuhan terbaik pada perlakuan glukosa. Sehingga, disimpulkan bahwa isolat TA.8, TA.14, TA.15 memiliki pertumbuhan terbaik pada pemberian glukosa sebagai sumber C pada media kulturnya.

Glukosa adalah salah satu golongan monosakarida, yang kandungan gulanya dimanfaatkan menjadi sumber energi. Bentuk nutrisi yang terkandung dalam glukosa sangat sederhana, menjadikan bakteri mudah memanfaatkannya untuk pertumbuhan yang optimal. Fungsi lain dari penambahan sumber C yaitu glukosa ke dalam media adalah perangsang bakteri dalam memanfaatkan sumber N (Yustina, dkk. 2016). Setelah dilakukan pemilihan sumber C maka selanjutnya akan dilakukan pemilihan sumber N, dan dilanjutkan dengan optimalisasi konsentrasi glukosa sebagai sumber C terpilih untuk pengkayaan media kultur.

#### **4.2.2.2. Pemilihan Sumber N Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur**

Hasil isolat bakteri yang telah didapatkan, selanjutnya dilakukan pemilihan sumber N. Sumber N yang digunakan antara lain amonium nitrat, amonium klorida, urea. Data hasil seleksi sumber N dapat dilihat pada tabel 4.3. Sumber N terpilih berdasarkan kecepatan generasi tertinggi.

Tabel 4.3. menunjukan bahwa isolat TA.8 memiliki jumlah generasi terbaik pada perlakuan amonium nitrat yaitu  $4,819 \pm 0,121$  berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (-) yang sebesar  $3,289 \pm 0,278$ , berbeda nyata pula dengan

perlakuan urea yaitu sebesar  $3,988 \pm 0,066$  namun, tidak berbeda nyata terhadap amonium klorida sebesar  $4,523 \pm 0,073$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada perlakuan kontrol dengan nilai  $12,820 \pm 1,038$  berbeda nyata dengan perlakuan amonium nitrat sebesar  $8,718 \pm 0,223$  berbeda nyata pula dengan perlakuan amonium klorida yang bernilai  $9,289 \pm 0,151$ , dan berbeda nyata dengan urea  $10,530 \pm 0,178$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada perlakuan amonium nitrat yaitu  $0,079 \pm 0,002$  meskipun tidak berbeda nyata terhadap amonium klorida yang sebesar  $0,074 \pm 0,001$ . Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.8 memiliki pertumbuhan terbaik pada perlakuan amonium nitrat.

Tabel 4.3. menunjukkan bahwa isolat TA.14 memiliki jumlah generasi terbaik pada perlakuan amonium nitrat yaitu  $4,786 \pm 0,067$  berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (-) yang sebesar  $3,818 \pm 0,305$ , berbeda nyata pula dengan perlakuan urea yaitu sebesar  $4,262 \pm 0,131$ , berbeda nyata dengan amonium klorida sebesar  $4,239 \pm 0,084$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada perlakuan kontrol dengan nilai  $11,040 \pm 0,859$  berbeda nyata dengan perlakuan amonium nitrat sebesar  $8,776 \pm 0,125$  berbeda nyata pula dengan perlakuan amonium klorida yang bernilai  $8,494 \pm 0,17$ , namun tidak berbeda nyata dengan urea  $9,859 \pm 0,309$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada perlakuan amonium klorida yaitu  $0,081 \pm 0,001$  meskipun tidak berbeda nyata terhadap amonium nitrat yang sebesar  $0,078 \pm 0,001$ . Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.14 memiliki pertumbuhan terbaik pada perlakuan amonium nitrat.

Tabel 4.3. menunjukkan bahwa isolat TA.15 memiliki jumlah generasi terbaik pada perlakuan urea yaitu sebesar  $5,026 \pm 0,121$  berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (-) yang sebesar  $3,353 \pm 0,242$  berbeda nyata dengan perlakuan amonium klorida yaitu sebesar  $3,942 \pm 0,108$ , berbeda nyata pula dengan amonium nitrat sebesar  $3,624 \pm 0,119$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada perlakuan kontrol dengan nilai  $12,560 \pm 0,87$  berbeda nyata dengan perlakuan amonium klorida sebesar  $10,650 \pm 0,298$  berbeda nyata dengan perlakuan urea yang sebesar  $8,359 \pm 0,204$  dan berbeda nyata pula dengan amonium nitrat yang sebesar  $8,282 \pm 0,273$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada perlakuan amonium nitrat yaitu  $0,083 \pm 0,002$  meskipun tidak berbeda nyata terhadap urea yang sebesar  $0,082 \pm$



0,002. Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.15 memiliki pertumbuhan terbaik pada perlakuan amonium nitrat.

Sehingga, disimpulkan bahwa isolat TA.8, TA.14, TA.15 memiliki pertumbuhan terbaik pada pemberian amonium nitrat sebagai sumber N pada media kulturnya. . Ammonium nitrat adalah senyawa dengan rumus kimia  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  yang disederhanakan menjadi  $\text{N}_2\text{H}_4\text{O}_3$ , senyawa ini sangat mudah larut dalam air. Umumnya, senyawa ammonium nitrat mudah dijumpai di alam sebagai mineral alami dan bersanding dengan mineral garam lain seperti natrium nitrat (Yustina, *dkk*, 2016). Setelah dilakukan pemilihan sumber N maka selanjutnya akan dilakukan optimalisasi konsentrasi amonium nitrat sebagai sumber N terpilih untuk pengkayaan media kultur.

### **4.2.3. Optimalisasi Konsentrasi Sumber C dan N**

#### **4.2.3.1 Konsentrasi Sumber C Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur**

Sumber C terpilih yaitu glukosa, selanjutnya dilakukan uji konsentrasi konsentrasi sebesar 0,5%, 1,5%, 2,5%. Data hasil konsentrasi sumber C dapat dilihat pada tabel 4.4. yang menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi sumber C berpengaruh terhadap jumlah generasi, waktu generasi, dan kecepatan pertumbuhan isolat TA.8, TA.14, TA.15. Konsentrasi sumber C yaitu glukosa terpilih berdasarkan kecepatan generasi tertinggi.

Berdasarkan tabel 4.4. isolat TA.8 memiliki jumlah generasi terbaik pada konsentrasi glukosa 2,5% yaitu sebesar  $3,983 \pm 0,077$  tidak berbeda nyata dengan konsentrasi glukosa 0,5% yaitu sebesar  $3,968 \pm 0,291$  namun berbeda nyata terhadap konsentrasi glukosa 1,5% yang sebesar  $3,450 \pm 0,117$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada konsentrasi glukosa 0,5% yaitu sebesar  $10,62 \pm 0,750$  tidak berbeda nyata dengan konsentrasi glukosa 1,5% yang sebesar  $10,44 \pm 0,362$  dan berbeda nyata dengan konsentrasi glukosa 2,5% yang sebesar  $3,039 \pm 0,178$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada konsentrasi glukosa 2,5% yang sebesar  $0,076 \pm 0,001$  berbeda nyata terhadap konsentrasi glukosa 1,5% yang sebesar  $0,066 \pm 0,002$  dan berbeda nyata pula dengan konsentrasi glukosa 0,5% yang sebesar

0,065 ± 0,004. Sehingga, pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.8 memiliki pertumbuhan terbaik pada konsentrasi glukosa 2,5%.

Isolat TA.14 memiliki jumlah generasi terbaik pada konsentrasi glukosa 0,5% sebesar 4,359 ± 0,199 tidak berbeda nyata dengan konsentrasi glukosa 2,5% sebesar 4,044 ± 0,133 akan tetapi berbeda nyata terhadap konsentrasi glukosa 1,5% yang sebesar 3,897 ± 0,069. Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada konsentrasi 0,5% yaitu sebesar 9,647 ± 0,435 tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 2,5% yang sebesar 8,907 ± 0,299 namun berbeda nyata dengan konsentrasi glukosa 1,5% yang sebesar 7,699 ± 0,138. Kecepatan generasi terbaik ada pada konsentrasi glukosa 1,5% yaitu sebesar 0,090 ± 0,011 berbeda nyata terhadap konsentrasi glukosa 2,5% maupun 0,5% yaitu berturut-turut 0,077 ± 0,002 dan 0,071 ± 0,003. Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.14 memiliki pertumbuhan terbaik pada konsentrasi glukosa 1,5%.

Isolat TA.15 memiliki jumlah generasi terbaik pada konsentrasi glukosa 0,5% yaitu 3,930 ± 0,284 tidak berbeda nyata dengan konsentrasi glukosa 1,5% maupun 2,5% yaitu berturut-turut 3,717 ± 0,092 dan 3,687 ± 0,098. Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada konsentrasi 0,5% sebesar 10,72 ± 0,747 meskipun tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 2,5% yang sebesar 9,759 ± 0,184 namun berbeda nyata dengan konsentrasi 1,5% sebesar 8,074 ± 0,204. Kecepatan generasi terbaik ada pada konsentrasi glukosa 1,5% yaitu sebesar 0,085 ± 0,002 berbeda nyata terhadap konsentrasi glukosa 0,5% maupun 2,5% yang secara berturut-turut sebesar 0,064 ± 0,004 dan 0,071 ± 0,001. Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.15 memiliki pertumbuhan terbaik pada konsentrasi glukosa 0,5%.

Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi glukosa pada masing-masing isolat berbeda. Konsentrasi glukosa terbaik bagi isolat TA.8 sebesar 2,5%, sedangkan untuk isolat TA.14 dan TA.15 adalah 1,5%.

#### **4.2.3.2 Konsentrasi Sumber N Terbaik dalam Pengkayaan Media Kultur**

Sumber N terpilih yaitu ammonium nitrat, selanjutnya dilakukan uji konsentrasi konsentrasi sebesar 0,05%, 0,15%, 0,25%. Data hasil konsentrasi

sumber N dapat dilihat pada tabel 4.5. yang menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi sumber N berpengaruh terhadap jumlah generasi, waktu generasi, dan kecepatan pertumbuhan isolat TA.8, TA.14, TA.15. Konsentrasi sumber N yaitu amonium nitrat terpilih berdasarkan kecepatan generasi tertinggi.

Berdasarkan tabel 4.5. menunjukkan bahwa isolat TA.8 memiliki jumlah generasi terbaik pada konsentrasi amonium nitrat 0,15% sebesar  $4,963 \pm 0,061$  berbeda nyata dengan konsentrasi 0,05% maupun 0,25% berturut-turut sebesar  $4,348 \pm 0,293$  dan  $4,486 \pm 0,063$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada konsentrasi 0,05% sebesar  $9,686 \pm 0,631$  tidak berbeda nyata dengan konsentrasi amonium nitrat 0,25% yang sebesar  $9,362 \pm 0,133$  namun berbeda nyata dengan konsentrasi amonium nitrat 0,05% yang sebesar  $8,463 \pm 0,105$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada konsentrasi amonium nitrat 0,15% yaitu sebesar  $0,081 \pm 0,001$  berbeda nyata dengan konsentrasi amonium nitrat 0,05% dan 0,25% berturut-turut sebesar  $0,071 \pm 0,004$  dan  $0,074 \pm 0,001$ . Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.8 memiliki pertumbuhan terbaik pada konsentrasi amonium nitrat 0,15%.

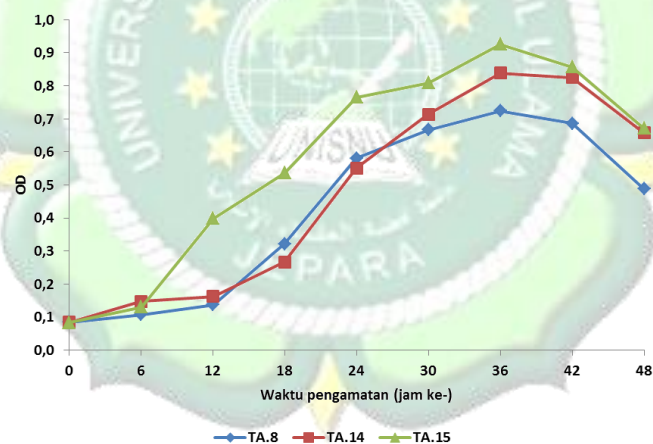
Isolat TA.14 memiliki jumlah generasi terbaik pada konsentrasi amonium nitrat 0,15% yaitu sebesar  $4,886 \pm 0,133$  berbeda nyata dengan konsentrasi 0,05% maupun 0,25% yang berturut-turut sebesar  $3,201 \pm 0,330$  dan  $4,079 \pm 0,133$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada konsentrasi 0,05% yaitu sebesar  $13,210 \pm 1,316$  berbeda nyata dengan konsentrasi 0,15% maupun 0,25% yang berturut-turut sebesar  $8,599 \pm 0,238$  dan  $10,290 \pm 0,287$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada konsentrasi amonium nitrat 0,15% yaitu sebesar  $0,080 \pm 0,002$  berbeda nyata terhadap konsentrasi amonium nitrat 0,05% maupun 0,25% berturut-turut sebesar  $0,052 \pm 0,005$  dan  $0,067 \pm 0,001$ . Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.14 memiliki pertumbuhan terbaik pada konsentrasi amonium nitrat 0,15%.

Isolat TA.15 memiliki jumlah generasi pada konsentrasi amonium nitrat 0,05% sebesar  $4,455 \pm 0,065$  tidak berbeda nyata dengan konsentrasi amonium nitrat 0,15% maupun 0,25% yang berturut-turut sebesar  $0,165 \pm 0,081$  dan  $4,358 \pm 0,162$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik ada pada konsentrasi 0,25% sebesar

$9,644 \pm 0,358$  tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0,05% yaitu sebesar  $9,427 \pm 0,137$  namun berbeda nyata dengan konsentrasi amonium nitrat 0,25% sebesar  $5,763 \pm 0,112$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada konsentrasi amonium nitrat 0,15% yaitu sebesar  $0,120 \pm 0,002$  berbeda nyata terhadap konsentrasi amonium nitrat 0,5% maupun 2.5% yang berturut-turut sebesar  $0,073 \pm 0,001$  dan  $0,071 \pm 0,002$ . Pengamatan ini menunjukkan bahwa isolat TA.15 memiliki pertumbuhan terbaik pada konsentrasi amonium nitrat 0,15%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi amonium nitrat pada isolat TA.8, TA.14 dan TA.15 adalah 0,15%.

#### 4.2.4. Kombinasi Pengkayaan Media

Bakteri yang inkubasi ke dalam media baru yang sesuai akan tumbuh memperbanyak diri. Jika pada waktu-waktu tertentu dilakukan perhitungan jumlah bakteri dan dibuat grafik hubungan antara jumlah bakteri dengan waktu maka akan diperoleh grafik atau kurva pertumbuhan seperti pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1.** Fase pertumbuhan bakteri hasil kombinasi sumber C dan N.

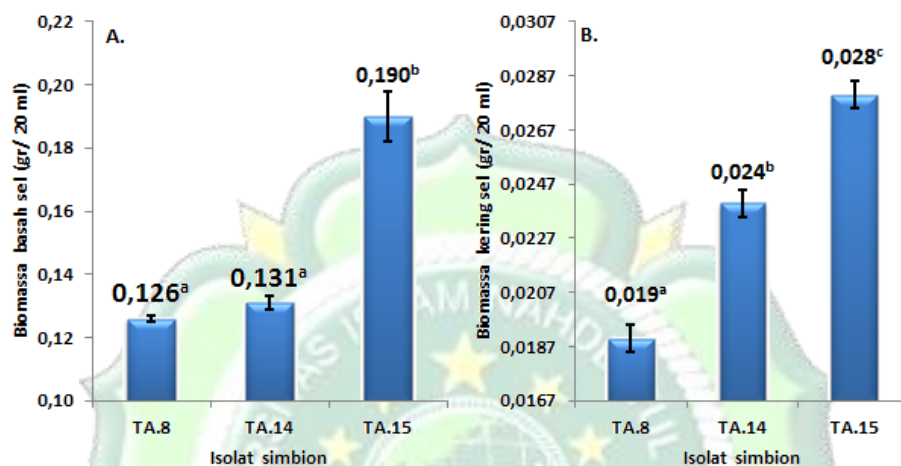
Bakteri mengalami beberapa fase dalam pertumbuhannya. Fase tersebut dimulai dengan fase lag (penyesuaian), fase log (eksponensial), fase stasioner dan kematian. Bakteri yang dimasukkan dalam media baru akan melakukan fase permulaan dengan menyesuaikan diri, sehingga pembelahan sel belum terjadi. Pembelahan sel dapat dirangsang melalui percepatan fase pertumbuhan, akan



tetapi waktu dalam generasi yang harus dilalui masih panjang. Fase lag adalah istilah untuk menyebut fase permulaan hingga fase pertumbuhan dipercepat. Isolat TA.8, TA.14, TA.15 mengalami fase lag pada 6 jam pertama yang ditunjukkan oleh gambar 4.1. Fase berikutnya yaitu fase pertumbuhan logaritma atau pertumbuhan eksponensial adalah proses pembelahan diri sel paling cepat dengan waktu generasi yang pendek dan konstan. Gambar 4.1. menunjukkan bahwa fase pertumbuhan dari isolat TA.8, TA.14, TA.15 dimulai pada jam ke-6 hingga jam ke-36. Selama fase logaritma, aktivitas metabolisme sel mengalami kenaikan, sel melakukan sintesis nutrisi dengan jumlah yang tetap sampai nutrisi habis atau hingga terjadi penimbunan hasil metabolisme yang memperlambat pertumbuhan. Ketika fase pertumbuhan mulai terhambat, kecepatan pembelahan sel juga berkurang dan jumlah sel mati mulai bertambah. Fase stasioner maksimum terjadi dengan jumlah sel yang konstan, diakibatkan oleh jumlah sel yang membelah sama dengan jumlah sel yang mengalami kematian, sehingga seolah tidak terjadi pertumbuhan. Gambar 4.1 tidak menunjukkan adanya fase stasioner. Hanya saja, pada jam ke-36 pertumbuhan isolat TA.8, TA.14, TA.15 mengalami fase pertumbuhan tertinggi atau disebut dengan fase puncak. fase puncak tersebut tidak berlangsung lama dikarenakan jam ke-42 kematian sel terus meningkat sedangkan sel tidak lagi mengalami pembelahan, logaritma kematian sel mengalami kecepatan maksimal dengan penurunan jumlah sel hidupnya deret ukur sehingga disebut dengan fase kematian dipercepat. Meskipun demikian penurunan jumlah sel hidup tidak akan mencapai nol, dan terus bertahan dalam waktu yang lama pada media tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri TA8, TA.14 dan TA.15 yang telah disesuaikan dengan kebutuhan sumber karbon dan nitrogennya memiliki pertumbuhan yang terbaik. Berdasarkan tabel 4.6. menunjukkan bahwa kombinasi nutrisi media kultur berpengaruh terhadap jumlah generasi, waktu generasi, dan kecepatan pertumbuhan isolat TA.8, TA.14, TA.15. Isolat TA.15 memiliki jumlah generasi terbaik yaitu sebesar  $4,508 \pm 0,068$  berbeda nyata dengan isolat TA.8 maupun isolat TA.14 yang berturut-turut sebesar  $4,085 \pm 0,039$  dan  $4,314 \pm 0,044$ . Sedangkan, waktu generasi terbaik diraih oleh isolat

TA.8 yang sebesar  $8,812 \pm 0,085$  berbeda nyata dengan isolat TA.14 maupun isolat TA.15 yang berturut-turut sebesar  $8,344 \pm 0,084$  dan  $7,986 \pm 0,120$ . Kecepatan generasi terbaik ada pada isolat TA.15 yaitu  $0,086 \pm 0,001$  berbeda nyata dengan TA.8 maupun TA.14 yang berturut-turut sebesar  $0,078 \pm 0,001$  dan  $0,083 \pm 0,001$ . Sehingga, pertumbuhan isolat TA.15 lebih tinggi dibanding dengan isolat TA.8 maupun TA.14. Pertumbuhan isolat TA.15 yang lebih tinggi dapat dilihat pula pada gambar 4.1.



**Gambar 4.2.** A. Biomasa basah, B. Biomasa kering

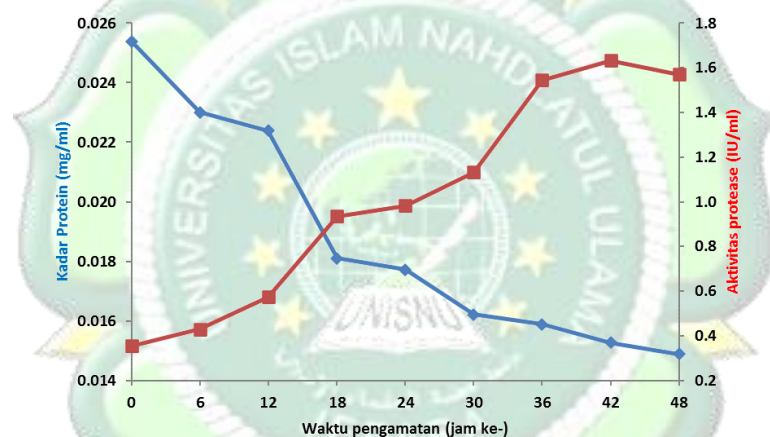
Gambar 4.2. menunjukkan hubungan kolerasi positif antara biomasa basah dan biomasa kering. Biomasa basah maupun biomasa kering tertinggi adalah TA.15. Isolat TA.15 yang seberat 0,190 gr/20ml pada biomasa basah berbeda nyata dengan TA.8 yang seberat 0,126 gr/20ml maupun TA.14 yang seberat 0,131 gr/20ml. Biomasa kering TA.15 seberat 0,028 gr/20ml, berbeda nyata dengan isolat TA.14 yang memiliki berat 0,024 gr/20ml, dan TA.8 dengan berat 0,019 gr/20ml.

#### 4.2.5. Aktivitas Protease

Kadar protein tertinggi yang tertera pada tabel 4.7. dimiliki oleh isolat TA.8 dengan kadar  $0,014 \pm 0,0001$  berbeda nyata dengan isolat TA.14 yang berkadar  $0,013 \pm 0,0007$  dan TA.15 yang hanya berkadar  $0,012 \pm 0,0006$ . Begitupun dengan total protein, isolat TA.8 menjadi yang tertinggi dengan kadar  $0,014 \pm 0,0001$  berbeda nyata dengan isolat TA.14 yang berkadar  $0,013 \pm 0,0007$  dan

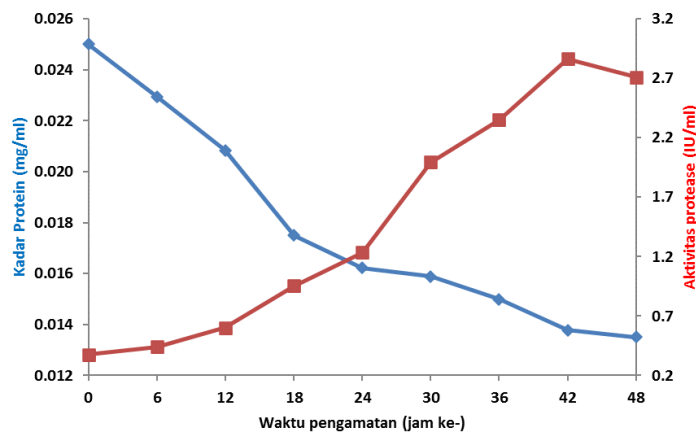
TA.15 yang hanya berkadar  $0,012 \pm 0,0006$ . Tabel 4.7. juga menunjukkan aktivitas protease dengan total aktivitas protease. Aktivitas protease terbaik dimiliki oleh isolat TA.15 yaitu  $3,253 \pm 0,022$  berbeda nyata dengan isolat TA.14 yang  $2,864 \pm 0,125$  dan berbeda nyata pula dengan isolat TA.8 yang hanya  $1,632 \pm 0,069$ . Begitupun dengan total aktivitas protease, isolat TA.15 menjadi yang terbaik yaitu  $1626 \pm 11$ , berbeda nyata dengan isolat TA.14 yaitu  $1432 \pm 62$  dan TA.8 sebesar  $816 \pm 34$ .

Berdasarkan hasil tabel 4.6. dan tabel 4.7. menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki hubungan korelasi positif antara pertumbuhan bakteri dengan aktivitas protease. Selain itu, juga terdapat hubungan korelasi negatif antara aktivitas protease dengan kadar protein pada masing-masing isolat yang ditunjukkan oleh gambar 4.3., gambar 4.4., dan gambar 4.5.



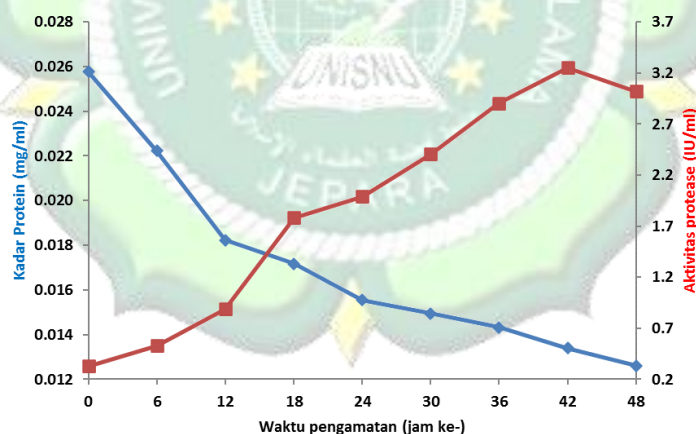
**Gambar 4.3.** Kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.8

Kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.8 yang ditunjukkan oleh gambar 4.3. menunjukkan korelasi negatif antara keduanya. Kadar protein yang semula tinggi pada jam ke-0 terus mengalami penurunan hingga jam ke-48. Penurunan kadar protein ini berbanding terbalik dengan aktivitas protease yang rendah pada jam ke-0 namun mengalami peningkatan hingga jam ke-48. Titik seimbang antara jumlah kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.8 terjadi waktu yang mendekati jam ke-18.



**Gambar 4.4.** Kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.14

Kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.14 yang ditunjukkan oleh gambar 4.4. juga menunjukkan kolerasi negatif antara keduanya. Kadar protein yang semula tinggi pada jam ke-0 terus mengalami penurunan hingga jam ke-48. Penurunan kadar protein ini berbanding terbalik dengan aktivitas protease yang rendah pada jam ke-0 namun mengalami kenaikan hingga jam ke-48. Titik seimbang antara jumlah kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.14 terjadi pada waktu yang mendekati jam ke-24.



**Gambar 4.5.** Kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.15

Kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.15 yang ditunjukkan oleh gambar 4.5. menunjukkan kolerasi negatif antara keduanya. Kadar protein yang semula tinggi pada jam ke-0 terus mengalami penurunan hingga jam ke-48. Penurunan kadar protein ini berbanding terbalik dengan aktivitas protease yang



rendah pada jam ke-0 namun mengalami kenaikan hingga jam ke-48. Titik seimbang antara jumlah kadar protein dan aktivitas protease isolat TA.15 terjadi pada antara jam ke-12 dan jam ke-18.

Aktivitas ekstraseluler sintesis protease sering terjadi pada fase stasioner, yang erat kaitannya dengan mekanisme represi katabolit. Hambatan represi katabolit akan dialami sel selama fase pertumbuhan eksponensial, sehingga konsentrasi cAMP intraseluler mengalami penurunan yang justru mengaktifkan transkripsi mRNA penyandi protease (Suhartono, 2017). Langkah pertama bakteri dalam melakukan metabolisme berupa penguraian adalah terjadinya Difusi yang menyebabkan masuknya substrat dalam membran sel. Namun, makronutrien akan tertahan di dinding sel dimana aktivitas degradasi ekoenzim dikeluarkan melalui dinding tersebut pula. Sehingga penguraian senyawa organik dalam sitoplasma merupakan bentuk reaksi dari sel tersebut (Notodarmojo, 2005).

Ketiga isolat bakteri dalam penelitian ini memiliki genus berbeda-beda. Isolat dengan kode TA.8 dan TA.14 terklasifikasi dalam genus *Bacillus*, sedangkan TA.15 tergolong dalam genus *Architobacter*. Genus bakteri *Bacillus* pada kondisi normal melakukan sintesis enzim ekstraseluler teraktif pada akhir fase eksponensial hingga awal fase stasioner (Suhartono, 2017). Penelitian yang pernah dilakukan oleh Chanta wannakul *et.al.*, (2002) menyatakan bahwa bakteri *Bacillus Subtilis* muncul dalam bentuk sel vegetatif selama 12 jam pertama, kemudian 16 hingga 24 jam periode inkubasi mulai terbentuk spora. Pernyataan tersebut mengindikasikan bahwa produksi protease mencapai puncak pada fase eksponensial dan berlangsung secara konstan saat terbentuknya spora. Terjadinya penurunan aktivitas protease atau penurunan laju aktivitas katalitik disebabkan oleh perubahan struktur enzim. Perubahan bentuk struktur enzim yang awalnya aktif menjadi pasif menyebabkan penurunan aktivitas enzim dalam mengikat substrat (Suhartono, 2017). *Bacillus* sp. dan *Architobacter* sp. berkemampuan proteolitik berkaitan dengan kondisi optimum pertumbuhan. Pengkayaan sumber C yaitu glukosa dan sumber N yaitu amonium nitrat dengan konsentrasi yang sesuai berpengaruh pada tingginya pertumbuhan bakteri.