

**INDUKSI PRODUKSI ENZIM AZOREDUKTASE EKSTRASELULER  
DARI BAKTERI *Pseudomonas stutzeri***

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains Bidang Studi Kimia**



**Oleh :**

**TIUR PEBRI ANDIKA**

**08031381823057**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

**2022**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**INDUKSI PRODUKSI ENZIM AZOREDUKTASE EKSTRASELULER  
DARI BAKTERI *Pseudomonas stutzeri***

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains Bidang Studi Kimia

Oleh :

**TIUR PEBRI ANDIKA**  
**08031381823057**

Indralaya, 07 November 2022

**Mengetahui,**

**Pembimbing I**



**Dra. Julinar, M.Si.**

NIP. 196507251993032002

**Pembimbing II**



**Nova Yuliasari, M.Si.**

NIP. 197307261999032001

**Dekan FMIPA**



**Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph.D**

NIP. 197111191997021001

## HALAMAN PERSETUJUAN

Karya tulis ilmiah berupa skripsi dengan judul “Induksi Produksi Enzim Azoreduktase Ekstraseluler dari Bakteri *Pseudomonas stutzeri*” telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji Sidang Sarjana Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada tanggal 01 November 2022 dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai masukan yang telah diberikan.

Indralaya, 07 November 2022

Ketua :

1. **Dr. Eliza, M.Si.**

NIP. 196407291991022001

(  )

Sekretaris :

1. **Dr. Desnelli, M.Si.**

NIP. 196912251997022001

(  )

Pembimbing:

1. **Dra. Julinar, M.Si.**

NIP. 196507251993032002

(  )

2. **Nova Yuliasari, M.Si.**

NIP. 197307261999032001

(  )

Penguji :

1. **Prof. Hermansyah, Ph.D**

NIP. 197111191997021001

(  )

2. **Dr. Ferlinahayati, M.Si.**

NIP. 197402052000032001

(  )

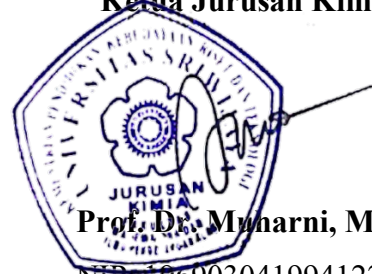
Mengetahui,



**Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph.D**

NIP. 197111191997021001

Ketua Jurusan Kimia



**Prof. Dr. Murnani, M.Si.**

NIP. 196903041994122001

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama Mahasiswa : Tiur Pebri Andika  
NIM : 08031381823057  
Fakultas/Jurusan : MIPA/Kimia

Menyatakan bahwa

skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan karya ilmiah ini belum pernah diajukan sebagai pemenuhan persyaratan untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata (S1) dari Universitas Sriwijaya maupun perguruan tinggi lain. Semua informasi yang dimuat dalam skripsi ini yang berasal dari penulis lain baik yang dipublikasikan atau tidak telah diberikan penghargaan dengan mengutip nama sumber penulis secara benar. Semua isi dari skripsi ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya sebagai penulis.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Indralaya, 07 November 2022

Yang menyatakan,



Handwritten signature of Tiur Pebri Andika.

Tiur Pebri Andika

NIM. 08031381823057

**HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK  
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademik Universitas Sriwijaya, yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama Mahasiswa : Tiur Pebri Andika

NIM : 08031381823057

Fakultas/Jurusan : MIPA/Kimia

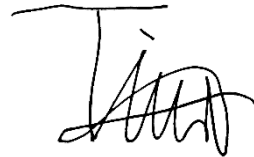
Jenis karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sriwijaya “Induksi Produksi Enzim Azoreduktase Ekstraseluler dari Bakteri *Pseudomonas stutzeri*” dengan hak bebas royalti non-eksklusif ini Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalih, edit/memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan mempublikasikan tugas akhir atau skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/ pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Indralaya, 07 November 2022

Yang menyatakan,



Tiur Pebri Andika

NIM. 08031381823057

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*“Maka sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan  
Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan”  
(QS. Al-Insyirah: 5 - 6)*

*“Tidak ada balasan untuk kebaikan selain kebaikan pula”  
(QS. Ar-Rahman: 60)*

*“I’m a forest and a night of dark trees: but who is not afraid of my  
darkness, i wish you will find banks full of roses under my  
cypresses”  
(Friedrich Nietzsche)*

---

**Skripsi ini sebagai tanda syukurku kepada:**

- Allah SWT
- Nabi Muhammad SAW

**Skripsi ini saya persembahkan kepada:**

1. Kedua orang tua tercinta yang senantiasa mendoakan dan memberikan motivasi
2. Dosen pembimbing (Dra. Julinar M.Si dan Nova Yuliasari M.Si)
3. Saudara, keluarga besar, sahabat dan semua orang yang membantu hingga terselesaikannya skripsi ini
4. Kampusku (Universitas Sriwijaya)

## KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah SWT yang maha pengasih lagi maha penyayang. Saya panjatkan puji dan syukur atas kehadirat-Nya yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan inayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Induksi Produksi Enzim Azoreduktase Ekstraseluler dari Bakteri *Pseudomonas stutzeri*”. Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana (S1) Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya.

Proses penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari berbagai rintangan yang dilalui, mulai dari pencarian judul, literatur, penelitian, pengumpulan data, pengolahan data dan penulisan. Namun dengan kesabaran dan ketekunan yang dilandasi dengan rasa tanggung jawab sebagai mahasiswa serta bantuan dari berbagai pihak lain baik berupa moril maupun materil akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan. Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Ibu **Dra. Julinar, M.Si** dan Ibu **Nova Yuliasari, M.Si** yang telah banyak membantu, memberikan bimbingan, bantuan, saran, nasehat dan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan nikmat-Nya yang sangat luar biasa kepada penulis.
2. Kedua orangtua (Bapak Karnilis Yaumid dan Ibu Yusmala Dewi) yang telah memberikan do'a, kasih sayang, motivasi dan dukungan moril dan materil dari lahir hingga sekarang. Gelar ini saya persembahkan kalian berdua sebagai rasa sayang dan tanggung jawab kepada orangtua. Insyaallah saya akan memberikan kebahagiaan kepada kalian dan mencapai semua harapan yang telah kalian harapkan kepada saya.
3. Bapak Hermasyah, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Dekan FMIPA Universitas Sriwijaya.
4. Ibu Prof. Dr. Muharni, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya.

5. Bapak Dr. Addy Rachmat, M.Si selaku Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya.
6. Bapak Hermansyah, Ph.D dan Ibu Ferlinahayati, M.Si selaku pembahas dan penguji sidang sarjana.
7. Seluruh Dosen FMIPA Universitas Sriwijaya yang telah memberikan ilmu, mendidik dan membimbing selama
8. Yuk Nur, Yuk Niar dan Yuk Yanti selaku analis kimia dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA yang telah membantu selama penelitian, semoga kebaikan kalian senantiasa dibalas oleh Allah SWT.
9. Kak Chosiin dan Mba Novi selaku Admin Jurusan Kimia yang selalu sabar serta banyak membantu selama masa perkuliahan hingga lulus.
10. Saudara dan saudariku (Theo Ahaddin Juliandy, Megawati dan Tryan Seftiansyah) yang selalu mendo'akan dan memberikan semangat serta masukan kepada penulis.
11. Ra'afiud dan Lidya selaku teman seperjuangan tugas akhir. Terimakasih atas kerja keras kalian dan telah banyak membantu serta saling memberikan semangat satu sama lain dalam melewati kendala dan drama baik saat di dalam lab maupun saat penulisan hingga selesai. Mohon maaf apabila sering merepotkan kalian, semoga ilmu yang kita dapatkan menjadi berkah. Jangan lupa bersyukur, semangat terus dan sukses selalu. Goodluck kedepannya dengan apapun yang dilakukan.
12. Sahabat – sahabatku Mulok Uyee (Alep, Caca, Chand, Mita, Naberi, Oger, Rahmad, Rekha, Remy, Wahyu dan Wendy) terimakasih selalu ada dan selalu berbagi cerita dalam suka maupun duka, terimakasih karena terus memberikan banyak pengalaman hidup berarti dari masa SMA hingga sekarang. Semoga kebersamaan kita terus diiringi dengan drama yang dapat dilewati bersama. Gasss Bromo.
13. Damri Squad (Ade, Dinda, Fiud, Ilyas, Irene, Iqbal, Lidya, Tejak, Sandi dan Prima) terimakasih atas kebersamaannya semenjak maba hingga sekarang yang melahirkan banyak cerita dan keseruan kehidupan dikampus, pp Palembang – Layo sampai tamat. \*lunasin lapangan badminton dulu hehe



14. Luo yi (Afif, Eko, Ikki, Jansen, Prima dan Zaki) yang memberikan ruang dalam melupakan sejenak rumitnya perkuliahan dengan bermain game dan melakukan hal – hal seru lainnya. Terimakasih keceriaannya dan semoga kelak masih dapat ceria bersama disela – sela kesibukan masing – masing.
15. Delapan Naga (Eko, Fiud, Ilyas, Iqbal, Sandi, Tejak dan Prima) terimakasih kepada kalian yang selalu membahas semua hal mulai yang penting sampai hal sepele, terimakasih sudah menghadirkan tawa di setiap cerita yang ada. Tetaplah dengan kerusuhan dan kekonyolan kalian. Semoga kalian sukses dengan apa yang dijalani. Tapi sebelum ngejalanin sesuatu gas ke warnet dulu login.
16. Kidzone (Afif, Ariqah, Eko dan Tatake) terimakasih telah memberikan kehidupan kampus jadi lebih berwarna dan menjadi teman dalam seluruh kegiatan yang berkaitan mengenai hal – hal seru. Semoga kita terus senantiasa diberikan kesempatan untuk terus bermain bersama.
17. Grup Terselubung (Anin, Ariqah, Dwi, Ghifar, Ikki, Ifa, Iin, Meta, Mita, Nurul, Obi, Restri dan Zaqiya) yang telah banyak membantu dan memberikan info dalam hal perkuliahan dan cerita “lainnya”. Terimakasih atas bantuan dan kerja keras kalian selama masa perkuliahan. Semoga ilmu yang didapat berkah dan kita semua diberikan kemudahan dalam mencapai kesuksesan.
18. Rekan – rekan konsentrasi Biokimia (Yuk Dwita, kak Getari, kak Rani, kak Mela, bang Apres, Fiud, Iqbal, Lidya, Mahdi, Rolis, Bening, Fira, Reza, Iqbal, Jefri, Agung, Ragil, Kelly, Venan dll) Terimakasih telah berbagi ilmu, cerita dan pengalaman baik itu mengenai kegiatan di dalam lab maupun di luar lab. Semoga kita semua selalu diberikan kelancaran dengan kegiatan yang sedang dilakukan. Semangat teruss.
19. Teman – teman seperjuangan Kimia 2018 terimakasih untuk kebersamaan, keceriaan dan ke’bar – bar’an kalian selama perkuliahan ini. Semangat dan sukses untuk kita semua. See y’all on top.
20. Kakak tingkat angkatan 2016 - 2017 dan adik tingkat angkatan 2019 – 2020 serta seluruh pihak yang terlibat dalam penelitian maupun penulisan yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih dukungan dan semangatnya.

## SUMMARY

### INDUCTION OF EXTRACELLULAR AZOREDUCTASE FROM *Pseudomonas stutzeri* BACTERIA

Tiur Pebri Andika : Supervised by Dra. Julinar, M.Si and Nova Yuliasari, M.Si  
Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Science. Sriwijaya  
University

xi + 52 pages, 1 table, 12 pictures, 11 attachments

Azoreductase enzymes can be produced from the bacteria *Pseudomonas stutzeri*, but the enzyme activity produced is relatively low. Therefore, this study aimed to induce the production of extracellular azoreductase enzymes from *Pseudomonas stutzeri* by adding inducers (calcium chloride, calcium carbonate and methyl red) to the media production.

Induction process on enzyme production was carried out by adding 1 mM inducer into media NB. The bacterial culture of *Pseudomonas stutzeri* was incubated for 2x24 hours at 37°C in an incubator. Furthermore culture was centrifugated at 3000 rpm for 15 minutes to obtain a crude extract of extracellular azoreductase enzyme.

Crude extract of azoreductase enzyme from *Pseudomonas stutzeri* bacteria without the addition of inducer gave enzyme activity of 0.0776 U/mL and a specific enzyme activity of 0.0048 U/mg. Fractination of azoreductase was carried out using several variable of ammonium sulfate saturation. The highest activity was fraction 3 with a saturation level of 40% - 60%. Fraction 3 without the addition of inducer resulted in enzyme activity of 0.1093 U/mL and a specific enzyme activity of 0.0703 U/mg. The highest fraction by addition inducer also obtained at fraction 3. The addition of calcium chloride resulted inducer enzyme activity of 0.1373 U/mL and a specific enzyme activity of 0.2330 U/mg. Addition of calcium carbonate inducer enzyme activity of 0.1353 U/mL and a specific activity of 0.1146 U/mg. Addition of methyl red inducer resulted in enzyme activity of 0.1183 U/mL and a specific enzyme activity of 0.0840 U/mg.

Based on the results of the determination of the enzyme activity test, it can be seen that the addition of an inducer can increases enzyme activity. The highest enzyme activity was obtained from the addition of calcium chloride with an enzyme specific activity value of 0.2330 U/mg, meanwhile a specific enzyme activity without the addition of an inducer 0.0703 U/mg.

**Keywords** : Enzyme induced, Azoreductase, *Pseudomonas stutzeri*

**Citation** : 62 (1982 – 2022)

**RINGKASAN**  
**INDUKSI PRODUKSI ENZIM AZOREDUKTASE EKSTRASELULER**  
**DARI BAKTERI *Pseudomonas stutzeri***

Tiur Pebri Andika dibimbing oleh : Dra. Julinar, M.Si dan Nova Yuliasari, M.Si  
Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas  
Sriwijaya

xi + 52 halaman, 12 gambar, 7 lampiran, 1 tabel

Enzim azoreduktase dapat diproduksi dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* akan tetapi aktivitas enzim yang dihasilkan relatif kecil. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menginduksi produksi enzim azoreduktase ekstraseluler dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* dengan menambahkan *inducer* pada media produksi berupa kalsium klorida, kalsium karbonat dan metil merah.

Proses induksi produksi enzim dilakukan dengan menambahkan *inducer* 1 mM ke dalam media NB. Kultur bakteri *Pseudomonas stutzeri* yang telah diinkubasi selama 2x24 jam pada temperatur 37°C dalam inkubator, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, sehingga didapatkan ekstrak kasar enzim azoreduktase ekstraseluler.

Ekstrak kasar enzim azoreduktase dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* tanpa penambahan *inducer* didapatkan aktivitas enzim sebesar 0,0776 U/mL dan aktivitas spesifik enzim sebesar 0,0048 U/mg. Fraksinasi enzim azoreduktase dilakukan dengan menggunakan beberapa tingkat kejenuhan ammonium sulfat. Aktivitas tertinggi diperoleh pada fraksi 3 dengan tingkat kejenuhan 40% -60%. Fraksi 3 tanpa penambahan *inducer* aktivitas enzim sebesar 0,1093 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,0703 U/mg. Penambahan *inducer* setelah fraksinasi juga diperoleh aktivitas enzim tertinggi pada fraksi 3. Penambahan *inducer* kalsium klorida memiliki aktivitas enzim sebesar 0,1373 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,2330 U/mg. Penambahan *inducer* kalsium karbonat menghasilkan aktivitas enzim sebesar 0,1353 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,1146 U/mg. Penambahan *inducer* metil merah menghasilkan aktivitas enzim sebesar 0,1183 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,0840 U/mg.

Berdasarkan hasil penentuan uji aktivitas enzim diketahui penambahan *inducer* dapat meningkatkan aktivitas enzim. Aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada penambahan *inducer* kalsium klorida dengan nilai aktivitas spesifik enzim sebesar 0,2330 U/mg sedangkan tanpa penambahan *inducer* sebesar 0,0703 U/mg.

**Kata Kunci** : Induksi enzim, Azoreduktase, *Pseudomonas stutzeri*

**Kutipan** : 62 (1982 – 2022)

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>x</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Peneltian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Enzim.....	4
2.2 Aktivitas Enzim.....	5
2.3 Aktivitas Spesifik Enzim .....	7
2.4 Induksi Enzim.....	8

2.5 Isolasi dan Pemurnian Enzim .....	9
2.5.1 Ekstraksi Enzim .....	9
2.5.2 Fraksinasi Ammonium Sulfat .....	9
2.5.3 Dialisis.....	11
2.6 Enzim Azoreduktase.....	11
2.7 Zat Warna Azo.....	12
2.8 Bakteri <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	13
2.9 Spektrofometri <i>Ultraviolet – Visible</i> (UV – Vis) .....	13
 <b>BAB III METODELOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat.....	16
3.2 Alat dan Bahan .....	16
3.2.1 Alat.....	16
3.2.2 Bahan.....	16
3.3 Prosedur Penelitian.....	16
3.3.1 Sterilisasi Alat.....	16
3.3.2 Pembuatan Media.....	17
3.3.2.1 Media Nutrien Agar (NA).....	17
3.3.2.2 Media Nutrien Broth (NB).....	17
3.3.3 Produksi Enzim.....	17
3.3.3.1 Peremajaan Bakteri .....	17
3.3.3.2 Penyiapan Inokulum Bakteri.....	17
3.3.3.2.1 Inokulum Tanpa <i>Inducer</i> .....	17
3.3.3.2.2 Inokulum dengan Penambahan <i>Inducer</i> .	18
3.3.3.3 Kultivasi Bakteri .....	18
3.3.3.3.1 Kultur Tanpa <i>Inducer</i> .....	18

3.3.3.3.2 Kultur dengan Penambahan <i>Inducer</i> .....	18
3.3.3.4 Ekstraksi Enzim .....	18
3.3.4 Persiapan Substrat Metil Merah.....	18
3.3.4.1 Pembuatan Larutan Metil Merah 3000 $\mu$ M .....	18
3.3.4.2 Penentuan $\lambda$ Maksimum Metil Merah.....	19
3.3.5 Uji Aktivitas Enzim Azoreduktase dengan Metode Zimmermann.....	19
3.3.6 Penentuan Kadar Protein dengan Metoda Biuret.....	19
3.3.6.1 Pembuatan Kurva Standar BSA ( <i>Bovin Serum Albumin</i> ).....	19
3.3.6.2 Penentuan Kadar Protein Sampel.....	19
3.3.7 Fraksinasi Ammonium Sulfat .....	20
3.3.8 Dialisis.....	20
3.3.9 Analisis Data .....	20
3.3.9.1 Penentuan Kadar Protein.....	20
3.3.9.2 Aktivitas Enzim Azoreduktase .....	21
3.3.9.3 Aktivitas Spesifik.....	21

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

4.1 Ekstrak Kasar Enzim Azoreduktase Ekstraseluler dari Bakteri <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	22
4.2 Fraksi – fraksi Ammonium Sulfat dari Ekstrak Enzim Azoreduktase Ekstraseluler.....	23
4.3 Pengaruh Penambahan <i>Inducer</i> terhadap Enzim Azoreduktase Ekstraseluler.....	24
4.3.1 Pengaruh <i>Inducer</i> terhadap Kadar Protein .....	24
4.3.2 Pengaruh <i>Inducer</i> terhadap Aktivitas Enzim .....	25
4.3.3 Pengaruh <i>Inducer</i> terhadap Aktivitas Spesifik Enzim ....	26

#### **BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1 Kesimpulan.....	29
---------------------	----

5.2 Saran .....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>36</b>

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Grafik pH Optimum .....	5
Gambar 2. Grafik Temperatur Optimum .....	6
Gambar 3. Grafik Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Enzim.....	7
Gambar 4. Fraksinasi Ammonium Sulfat.....	10
Gambar 5. Mekanisme Reduksi Enzim Azoreduktase terhadap Ikatan Azo .....	12
Gambar 6. Struktur Zat Warna Azo (Metil Merah) .....	13
Gambar 7. Bakteri <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	14
Gambar 8. Enzim Azoreduktase Ekstraseluler dari Bakteri <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	22
Gambar 9. Dialisis Fraksi Ammonium Sulfat.....	23
Gambar 10. Kurva Pengaruh <i>Inducer</i> terhadap Kadar Protein .....	25
Gambar 11. Kurva Pengaruh <i>Inducer</i> terhadap Aktivitas Enzim.....	26
Gambar 12. Kurva Pengaruh <i>Inducer</i> terhadap Aktivitas Spesifik Enzim .....	27



## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Data Kadar Protein, Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim dari tiap Fraksi .....	23

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Pembuatan Larutan.....	37
Lampiran 2. Skema Kerja.....	38
Lampiran 3. Kurva Kalibrasi Larutan Standar BSA (Bovine Serum Albumin).....	39
Lampiran 4. Data dan Perhitungan Aktivitas Enzim, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik dari Ekstrak Kasar .....	41
Lampiran..5. Perhitungan Jumlah Ammonium sulfat yang digunakan untuk Fraksinasi .....	44
Lampiran 6. Tabel Ammonium sulfat .....	45
Lampiran 7. Data dan Perhitungan Aktivitas Enzim, Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Enzim Hasil Fraksinasi.....	46
Lampiran 8. Perhitungan Purifikasi Enzim .....	50
Lampiran 9. Gambar.....	51

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Industri tekstil berpotensi mencemari lingkungan dari hasil limbah cair yang didapat dari proses pewarnaan tekstil (Enrico, 2019). Limbah cair dari hasil pewarnaan mengandung zat warna azo yang apabila berada di permukaan perairan dapat dinyatakan sebagai polutan karena sifatnya yang mutagenik dan karsinogenik (Garg *and* Tripathi, 2017). Zat warna azo sulit terdegradasi secara hayati karena terdiri atas struktur aromatik kompleks yang terikat dengan satu ataupun lebih ikatan nitrogen – nitrogen (N=N) (Sudha *et al.*, 2014).

Limbah zat cair dapat di degradasi dengan beberapa proses kimia dan fisika seperti *reverse* osmosis, koagulasi, adsorpsi karbon aktif, fotokatalisis, oksidasi elektrokimia dan biodegradasi mampu untuk mendegradasi zat warna azo (Sarkar *et al* 2017). Biodegradasi dikatakan efektif dalam mendegradasi zat warna sintetik karena lebih ramah lingkungan, dan mengakibatkan pemudaran zat warna dengan adanya pemutusan ikatan azo dari zat warna (Adysari dan Effendi, 2010).

Proses biodegrasi melibatkan mikroorganisme seperti jamur, ragi dan bakteri dalam mendegrasi zat warna azo. Bakteri merupakan mikroorganisme yang paling umum digunakan dalam mendegradasi zat warna azo, isolat bakteri pada proses degradasi digunakan karena mudah beradaptasi pada suhu ekstrim, mudah dikultivasi dan proses pertumbuhannya cepat (Permatasari dkk, 2018). Bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi zat warna antara lain *Pseudomonas*, *Sphingomonos* dan *Bacillus* (Permatasari, 2018). Safely (2019) menyatakan bahwa bakteri *Pseudomonas stutzeri* mampu mendegradasi zat warna *congo red* melalui proses biodekolorisasi sebesar 82,70% pada kondisi optimum bakteri.

Degradasi zat warna oleh bakteri terjadi karena adanya kerja enzim azoreduktase. Azoreduktase dapat mereduksi ikatan azo yang bergantung pada NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen*) atau NADPH

(*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) yang berperan sebagai kofaktor dan untuk mereduksi zat warna azo menghasilkan produk berupa amina aromatik tak berwarna yang terdegradasi secara aerob dan anaerob oleh bakteri (Saranraj *et al*, 2014). Penelitian Zuhro (2022) aktivitas enzim azoreduktase yang dihasilkan dari isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri* masih tergolong rendah sehingga produksi enzim perlu ditingkatkan. Produksi enzim azoreduktase dapat ditingkatkan dengan melakukan penambahan molekul spesifik (*inducer*) saat proses inokulasi berlangsung (Berg, 2012). Berbagai macam senyawa kimia dapat berperan sebagai penginduksi enzim azoreduktase yakni aniline, veratrole, kalsium karbonat, kalsium klorida, guanicol dan triptofan (Dawkar *et al*, 2009). Penelitian ini dilakukan induksi produksi enzim azoreduktase ekstraseluler dengan penambahan *inducer* berupa metil merah, kalsium klorida dan kalsium karbonat pada media produksi dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* untuk mendapatkan enzim azoreduktase dengan cara fraksinasi menggunakan ammonium sulfat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang terdapat pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana aktivitas enzim azoreduktase ekstraseluler dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* ?
2. Bagaimana cara mengisolasi enzim azoreduktase ekstraseluler dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* ?
3. Bagaimana peranan penambahan *inducer* pada produksi enzim azoreduktase bakteri *Pseudomonas stutzeri* terhadap aktivitas enzim?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Menentukan aktivitas enzim azoreduktase ekstraseluler dari bakteri *pseudomonas stutzeri*
2. Mengisolasi enzim azoreduktase ekstraseluler dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* dengan cara fraksinasi ammonium sulfat
3. Menginduksi produksi enzim azoreduktase ekstraseluler dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* dengan *inducer* metil merah, kalsium klorida dan kalsium karbonat

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu mendapatkan sumber enzim azoreduktase ekstraseluler dari bakteri *Pseudomonas stutzeri* sebagai zat pendegrasi warna azo. Mendapatkan informasi terkait peranan metil merah, kalsium karbonat dan kalsium klorida sebagai *inducer* dalam menginduksi enzim azoreduktase yang ditambahkan pada proses produksi enzim azoreduktase. Penelitian ini diharapkan menjadi salah acuan dalam mengatasi masalah lingkungan yang ditimbulkan oleh limbah yang mengandung zat warna azo.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abo-State, M. A. M., Saleh, Y. E., and Hazaa, H. A. 2017. Decolorization of Congo Red dye by Bacterial Isolates. *Journal of Ecology of Health & Environment*. 5(2): 41–48.
- Adyasari, D dan Effendi, A. J. 2010, Pengaruh Perubahan Konsentrasi Ko-Substrat terhadap Populasi Mikroorganisme Pemutus Zat Warna Azo di Bioreaktor. *Jurnal Teknik Lingkungan*. 16(1): 72–81.
- Affandi, M. M. M., Tripathy, M., Shah, S. A. A., and Majeed, A. B. A. 2016. Solubility Enhancement of Simvastatin by Arginine: Thermodynamics, Solute–solvent Interactions and Spectral Analysis. *Drug design, development and therapy*. 10(1): 959.
- Ahmet, A.O., and H, Muhammed. 2018. A Case of *Pseudomonas stutzeri* Bacteremia in a Patient with Hematologic Malignancy. *Journal of Flora*. 15(1): 34–36.
- Alam, M. S., Sarjono, P. R dan Aminin, A. L.2013. Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari Bakteri Selulolitik Termofilik Kompos Pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah. *Jurnal Sains dan Matematika*. 21(2): 48–53.
- Basu, S., Agarwal, M., and Nath, G. 2015. An In vivo Wound Model Utilizing Bacteriophage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Ostomy/wound management*. 61(8): 16–23.
- Berg, M., Tymoczko J.L., and Stryer, L. 2012. *Biochemistry Seventh Edition*. W. H. Freeman and Company: New York.
- Bisswanger, H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1–6): 41–55.
- Blanco, A and Blanco, G. 2017. *Enzymes Medical Biochemistry*. Academic Press: London. 153–175.
- Cahyani, P., Wijanarka dan Raharjo, B. 2017. Aktivitas Spesifik Selulase *Serratia marcescens* dengan Variasi Konsentrasi Ammonium Sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dan pH. *Jurnal Biologi*. 6(2): 41–49.
- Chang, R. 2005. *Kimia Dasar: Konsep-Konsep Inti. Vol.2*. Penerbit Erlangga: Jakarta.
- Dawkar, V. V., Jadhav, U. U., Ghodake, G. S., and Govindwar, S. P. 2009. Effect of Inducers on the Decolorization and Biodegradation of Textile Azo Dye Navy Blue 2gl by *Bacillus Sp. Vus Biodegradation*. 20(6): 777–787.

- Dennison, C. 2002. *A Guide to Protein Isolation*. Kluwer Academic Publisher: New York.
- Djarkasi, G. S., Raharjo, S., and Noor, Z. (2017). Isolasi dan Akitivitas Spesifik Enzim Lipase Indigenous Biji Kenari. *Jurnal Teknologi Pertanian (Agricultural Technology Journal)*. 8(1).
- Doonan, S., and Paul, C. 2004. *Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 244)*. Humana Press: Totowa.
- Elfarash, A., Mawad, A. M., Yousef, N. M., and Shoreit, A. A. 2017. Azoreductase Kinetics and Gene Expression in the Synthetic Dyes-Degrading Pseudomonas. *Egyptian Journal Of Basic And Applied Sciences*. 4(4): 315–322.
- Enrico, E. 2019. Dampak Limbah Cair Industri Tekstil terhadap Lingkungan dan Aplikasi Teknik Eco Printing sebagai Usaha mengurangi Limbah. *Moda*. 1(1): 1–9.
- Fitria, F., Rahmani, N., Pujiyanto, S., Raharjo, B., dan Yopi, Y. 2017. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Xilanase dari Bakteri Laut *Bacillus safencis strain* LBF P20 Asal Pulau Pari Jakarta. *Agritech*. 37(1): 31–38.
- Gandhimathi, R., Vijayaraj, S., and Jyothirmaie, M. P. 2012. Analytical Process of Drugs by Ultraviolet (UV). *International Journal of Pharmaceutical Research % Analysis*. 2(2): 72–78.
- Garg, S. K., and Tripathi, M. 2017. Microbial Strategies for Discoloration and Detoxification of Azo Dyes from Textile Effluents. *Research Journal of Microbiology*. 12(1): 1–19.
- Gomaa, E. Z. 2016. Biodegradation and Detoxification of Azo Dyes ny Some Bacterial Strains. *Microbiology Journal*. 6(1): 15–24.
- Gorreti, M dan Purwanto, M. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visble. *Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*. 7(1): 1–17.
- Hamza, T. A. 2017. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *Int.J. Chem. Biomol. Sci*. 3(1):1–10.
- Hussein, S. I., Haider, N. H., Aziz, G. M., and Hussein, Z. A. 2017. Determination the Optimum Conditions of Laccase Production by Local Isolate of *Pseudomonas Aeruginosa* Sr3 Using Lab Scale Fermenter. *Int J Sci Nat*. 8(1): 1–10.

- Kandolla, H., Hasnah, N dan Maming 2013. Pengaruh Penambahan  $\text{CaCl}_2$  terhadap Produksi Enzim Protease dari *Bacillus licheniformis* HSA3-1a. *Skripsi* : Universitas Hasanuddin.
- Kiran, S., Ali, S., Asgher, M., and Anwar, F. 2012. Comparative Study on Decolorization of Reactive Dye 222 by White Rot Fungi *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Phanerochaete Chrysosporium* IBL-03. *African Journal of Microbiology Research*. 6(15): 3639–3650.
- Komansilan, S., Rosyidi, D., Radiati, L. E., dan Purwadi, P. 2019. Pengaruh Variasi pH dengan Penambahan Enzim Bromelin Alami (*Ananas Comucus*) terhadap Sifat Organoleptik Keju Cottage. *Jurnal Sains Peternakan*. 7(1): 54–61.
- Lade, H., Govindwar, S., and Paul, D. 2015. Low-cost Biodegradation and Detoxification of Textile Azo Dye CI Reactive Blue 172 by *Providencia rettgeri* strain HSL1. *Journal of Chemistry*. 2015: 1–10.
- Lalnunhlimi, S., and Krishnaswamy, V. 2016. Decolorization of Azo Dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by Moderately Alkaliphilic Bacterial Consortium. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 47: 39–46.
- Meena, S., Tripathi, A. D., and Ts, R. L. 2020. Optimization and Characterization of Alginic Acid Synthesized from a Novel Strain of *Pseudomonas stutzeri*. *ELSEVIER Journal*. 27(1): 1–10.
- Misal, S. A., and Gawai, K. R. 2018. Azoreductase: a Key Player of Xenobiotic Metabolism. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1): 1–9.
- Montoya, S, Sánchez, O, J., and Levin, L. 2015. Production of Lignocellulolytic Enzymes from Three White-rot Fungi by Solidstate Fermentation and Mathematical Modeling. *African Journal of Biotechnology*. 14(15): 1304–1317.
- Nurhayati, N., Mappiratu, M., dan Musafira, M. 2018. Pembuatan Konsentrat Protein dari Biji Kelor (*Moringa Oleifera L.*) dan Analisis Profil Asam Amino. Kovalen. *Jurnal Riset Kimia*. 4(1): 24–32.
- Oxoid. 2006. *Manual Oxoid Edisi 9*. Oxoid Limited: Bandung.
- Palamthodi, S., D. Patil and Y. Patil, 2011. Microbial Degradation of Textile Industrial Effluents. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 12657–12661.
- Paul, J., Kadam, A. A., Govindwar, S. P., Kumar, P., and Varshney, L. 2013. An Insight Into the Influence of Low Dose Irradiation Pretreatment on the Microbial Decolouration and Degradation of Reactive Red-120 Dye. *Chemosphere*. 90(4): 1348–1358.



- Permatasari, I., Nugroho, A. R dan Meitiniarti, I. V. 2018. Dekolorisasi Pewarna Tekstil Sumfix Blue dan Reactive Red 2 oleh Mikroba yang di Isolasi dari Limbah Industri Tekstil. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 5(1): 20–26.
- Putri, L. E. 2017. Penentuan Konsentrasi Senyawa Berwarna KMnO<sub>4</sub> dengan Metoda Spektroskopi UV Visible. *Natural Science Journal*. 3(1): 391-398.
- Rahmalia, S., Aziz, Y dan Zahrina, I. 2019. Efisiensi Adsorpsi beberapa Zat Warna Sintesis Golongan Azo menggunakan Hidroksiapatit. *Jom FTEKNIK*. 6(2): 1–5.
- Ratnaningtyas, S., Rusmana, I dan Akhdiya, A. 2017. Karakterisasi Enzim Pendegradasi AHL dari *Bacillus cereus* INT1c dan *Bacillus sp.* NTT3a. *Jurnal Sumber Daya Hayati*. 3(1): 14–20.
- Safely, V. A., Julinar, J., dan Purwaningrum, W. 2019. Dekolorisasi Zat Warna Congo Red Dan Limbah Zat Warna Tekstil Menggunakan Pseudomonas Stutzeri. *Skripsi*: Universitas Sriwijaya, Indralaya.
- Saranraj,P.D., Stella and Sivasakthivelan, P. 2014. Separation, Purification and Characterization of Dye Degrading Enzyme Azoreductase from Bacterial Isolates. *Central European Journal of Experimental Biology*. 3 (2):19–25.
- Sari, I. P., and Simarani, K. 2019. Comparative Static and Shaking Culture of Metabolite Derived from Methyl Red Degradation by *Lysinibacillus fusiformis* strain W1B6. *Royal Society open science*. 6(7): 190152.
- Sarip, M., Nugroho, T. T., and Teruna, H. Y. 2014. Isolasi, Uji Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim Selulase *Penicillium Sp. Lbkurcc27* Semimurni melalui Pengendapan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Jurnal Ilmu Sains*. 1(1): 1–6.
- Sarkar, B., Daware, A. V., Gupta, P., Krishnani, K. K., Baruah, S., and Bhattacharjee, S. 2017. Nanoscale Wide-band Semiconductors for Photocatalytic Remediation of Aquatic Pollution. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(33): 25775–25797.
- Seftiono, H. 2017. Penentuan Aktivitas Enzim Mananase dari Berbagai Mikroorganisme di Indonesia dan Peranannya dalam Bidang Pangan. *Jurnal Argointek*. 11(1): 16.
- Selim, M. S., Mahmoud, M. G., Rifaat, H. M., El Sayed, O. H., and El Beih, F. M. 2013. Effect of Inducers and Process Parameters on Laccase Production by Locally Isolated Marine *Streptomyces Lydicus* from Red Sea. *Int. J. Chem. Technol. Res*. 5(1): 15–23.

- Shah, M. P., Patel, K. A and Darji, A. M. 2013. Microbial Decolorization of Reactive Black by *Pseudomonas stutzeri* ETL-79. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*. 1(2): 47–42.
- Sharma S, Munjal A., and Gupta S. 2011. Comparative Studies on Decolorization of Textile Azo Dyes by Different Bacterial Consortia and Pure Bacterial Isolate. *J Pharm Res*. 4(1): 3180–3183.
- Sholihati, A.M., Bhaharudin, M dan Santi. 2012. Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus Subtilis*. *Jurnal Kimia*. 3(1): 8.
- Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., and Sivakumar, N. 2014. Microbial Degradation of Azo Dyes: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(2): 670-690.
- Suhito, I.M. 2016. Ekstraksi, Purifikasi, dan Karakterisasi Alkalin Protease dari Limbah Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*). *Skripsi*. Universitas Surabaya: Surabaya.
- Susanti, R dan Fidia, F. 2017. *Teknologi Enzim*. Andi Offset: Yogyakarta.
- Sutrisno, A. 2017. *Teknologi enzim*. Universitas Brawijaya Press: Malang.
- Syed, M. B and Venkatanagaraju. 2020. Factors Like Dilution and Mixing Influence Enzymatic Reactions. *Mapana Journal of Sciences*. 19(4): 31-35.
- Witono, Y ., Aulanni'am., Achmad, S dan Simon, B.W. 2007. Purifikasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantean*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 18(1) :1-9.
- Wuryanti. 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comusus L.*). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 7(3): 78–82.
- Xiuqin, C., Chunxia, B., Weiqi, S., Wei, Z., Jie, S., Yumei, D., Bin, W., Meiyong, Y., and Zhiyong, Y. 2013. Purification and Stability Characteristics of an Extracellular Alkaline Serine Protease from a Newly Isolated *Stenotrophomonas maltophilia* Strain D2. *African Journal of Microbiology Research*. 7(33): 4244–4250.
- Yoga, W.K.I.B. 2015. Penentuan Konsentrasi Optimum Kurva Standar Antioksidan; Asam Galat, Asam Askorbat dan Trolox terhadap Radikal Bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 Mm. *Proceedings Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA V*. 317-318.

- Zahran, S. A., Ali-Tammam, M., Hashem, A. M., Aziz, R. K., and Ali, A. E. 2019. Azoreductase Activity of Dye-decolorizing Bacteria Isolated from the Human Gut Microbiota. *Scientific reports*. 9(1): 1–14.
- Zimmermann, T., Kulla, H.G., and Leisinger, T. 1982. Properties of Purified Orange II Azoreductase the Enzyme Initiating Azo Dye Degradation by Pseudomonas KF46. *Evr.J. Biochem*. 129: 197–203.
- Zuhro, S., Julinar, J., dan Hidayati, N. 2022. Uji Aktivitas Enzim Azoreduktase Ekstraseluler dari Bakteri Pseudomonas Stutzeri. *Skripsi*: Universitas Sriwijaya.