

Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Protease Netral

Characterization of Thermophilic Bacteria in Producing Neutral Protease Enzymes

Widia Firliani^{*}), Anthoni Agustien, dan Fuji Astuti Febria

Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Andalas, Padang 25163

^{*}) Koresponden : firlianiwidia@yahoo.co.id

Abstract

A study on the characterization of thermophilic bacteria in producing neutral protease enzyme has been conducted in the Laboratory of Microbiology, Biology Department, Andalas University from October 2013 to March 2014. The bacteria were isolated from a hot spring at Sungai Medang, Kerinci. Water samples were collected purposively based on gradient temperature at the hot spring which ranged from 45^oC to 88^oC. Colony of the bacteria were inoculated using nutrient agar (NA). We obtained 10 isolates of neutral protease enzyme from the thermophilic bacteria with proteolytic index ranged from 0.27 to 3.89. The MIV-14 isolate has the highest proteolytic index which collected from 83^oC of the hot spring. Characterization of macroscopic, microscopic and biochemical tests were reported. Generally, the colonies have round shape, wavy edge, white, producing endospores and motile.

Keywords: characterization, neutral protease, thermophilic bacteria.

Pendahuluan

Mikroorganisme termofilik merupakan mikroorganisme yang dapat hidup pada temperatur suhu 45^oC - 88^oC. Mikroorganisme termofilik mengandung protein tahan panas dan tahan denaturasi sehingga mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan bersuhu ekstrim (Kumar dan Nussinov, 2001). Pengisolasian bakteri termofilik dari berbagai habitat dengan tujuan penggunaan bakteri dan enzim termostabil yang dihasilkan dari bakteri untuk diterapkan dalam dunia industri semakin intensif. Beberapa enzim termostabil mempunyai susunan asam amino yang sedikit berbeda dengan enzim yang sama dari bakteri mesofilik, yaitu banyak mengandung asam amino yang bersifat hidrofobik, salah satunya yaitu enzim protease (Madigan, Martinko dan Parker, 2000).

Protease adalah enzim yang mempunyai daya katalitik terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein yang menghasilkan asam amino dan peptida dengan bantuan molekul air (Rao, Tanksale, Gahtge, dan Deshpande, 1998).

Berdasarkan dari lingkungan daya kerjanya, protease dapat dikelompokkan menjadi protease netral, asam, dan alkali (Suhartono, 1991). Enzim protease netral merupakan enzim yang aktif pada pH netral (Ward, 1983). Enzim protease merupakan salah satu enzim komersial yang mempunyai nilai ekonomis tinggi karena mampu menguasai 59% dari total penjualan enzim dengan nilai mencapai 200 juta US\$ pertahun, dan memiliki peranan penting dalam industri pangan maupun non pangan. Contohnya dalam industri pangan seperti industri bir, daging, dan keju sedangkan dalam industri non pangan seperti detergen, kulit, farmasi, dan lain-lain (Suhartono, 1991). Beberapa enzim protease komersial yang banyak dikenal adalah papain dari papaya dan bromelin dari nanas yang biasanya digunakan untuk pengempuk daging (Rahayu, 2007).

Indonesia memiliki sumber daya alam yang mendukung dengan keanekaragaman jenis bakteri yang berasal dari sumber air panas. Salah satu sumber air panas yang terkenal berada di pulau Sumatera yang berlokasi di kolam air panas Sungai Medang. Sumber air panas ini

terletak di Kecamatan Air Hangat Timur Kabupaten Kerinci Jambi. Berdasarkan hasil survey diketahui bahwa suhu kolam air panas berkisar antara 45 - 88 °C dengan kisaran pH 8 - 8,7 termasuk air panas bersifat basa. Vegetasi sekitar sumber air panas berupa semak, rumput-rumputan, dan lumut. Mikroorganisme termofil merupakan kelompok mikroorganisme yang paling banyak diteliti diantara mikroorganisme ekstrimofil lainnya.

Identifikasi bakteri merupakan langkah awal dari rangkaian studi eksplorasi dan pemanfaatan bakteri indigenous suatu daerah. Identifikasi dapat dilakukan secara konvensional melalui karakteristik sifat biokimia dan mikroskopis sel bakteri, hingga berbasis molekuler. Saat ini informasi yang didapatkan mengenai karakterisasi bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan enzim protease netral dari sumber air panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi masih sedikit. Oleh sebab itu maka dilakukan penelitian mengenai karakterisasi bakteri penghasil enzim protease netral yang terdapat di sumber Air Panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi.

Metodologi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode survey lapangan dan dianalisa secara deskriptif dengan beberapa tahap prosedur kerja.

Isolasi Bakteri

Pengisolasian bakteri dilakukan pada sumber air panas Sungai Medang, dengan suhu kolam 45 - 88° C. Sampel kemudian diinokulasi ke medium *Nutrient Agar* dan di inkubasi pada suhu 50° C selama 24 jam.

Pemurnian Bakteri Termofilik

Biakan bakteri termofilik digoreskan pada medium NA. Biakan di inkubasikan pada suhu 50°C selama 48 jam. Koloni tunggal diinokulasikan pada biakan miring NA dan di inkubasikan pada suhu 50°C dalam inkubator selama 24 jam, kemudian disimpan sebagai stok bakteri (Atlas dan Ronald, 1997).

Penapisan Bakteri Termofilik Penghasil protease

Penapisan bakteri termofilik ini dilakukan menurut modifikasi dan metode (Benerjee *et al.*, 1999). Biakan miring bakteri termofilik ini diinokulasikan dengan menggunakan tusuk gigi steril pada medium susu skim. Kemudian di inkubasi pada suhu 50°C selama 24 – 48 jam. Koloni bakteri dan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri diukur diameternya dan selanjutnya ditentukan Indeks Proteolitik (IP):

$$IP = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

Dicatat isolat yang mempunyai IP yang paling tinggi (Agustien, 2010).

Karakterisasi dan Uji Biokimia Bakteri Termofilik

Karakterisasi bakteri termofilik dilakukan pada semua isolat yang didapatkan yang menghasilkan enzim protease netral. Pengamatan makroskopis dapat dilakukan dengan melihat bentuk koloni, elevasi koloni, tepian koloni, dan warna koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan pewarnaan gram, pewarnaan spora, uji motilitas. Karakterisasi sifat biokimia mencakup uji sitrat, gelatin, dan uji katalase.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri Termofilik

Hasil isolasi bakteri termofilik yang telah dilakukan pada 5 kolam sumber air panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi diperoleh 28 isolat bakteri. Tabel 1 menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang di inkubasi pada suhu 50°C ditemukan berbeda pada tiap-tiap kolam. Keberadaan bakteri termofilik pada sumber air panas ini disebabkan oleh kondisi lingkungan yang didukung oleh faktor biotik dan abiotik. Kondisi biotik di lingkungan sumber air panas yang mana terdapat rumput-rumputan, lumut dan sumber organik lainnya yang ditemukan di sekeliling sumber air panas tersebut sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi. Faktor abiotik juga berpengaruh terhadap keberadaan bakteri termofilik seperti pH basa yang disebabkan

oleh kandungan mineral tinggi sehingga menyebabkan tingginya keanekaragaman mikroorganisme (Madigan *et al.*, 2000 *cit* Agustien, 2010). Menurut Dirnawan, Suwanto, Purwadaria (2000) bahwa kondisi biotik seperti dedaunan yang gugur, ranting

dahan, rerumputan, serta bangkai serangga yang terdapat dalam sumber air panas merupakan bahan organik yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi mikroorganisme tersebut.

Tabel 1. Hasil isolasi bakteri termofilik dari sumber Air panas Sungai Medang yang diinkubasi pada suhu 50°C.

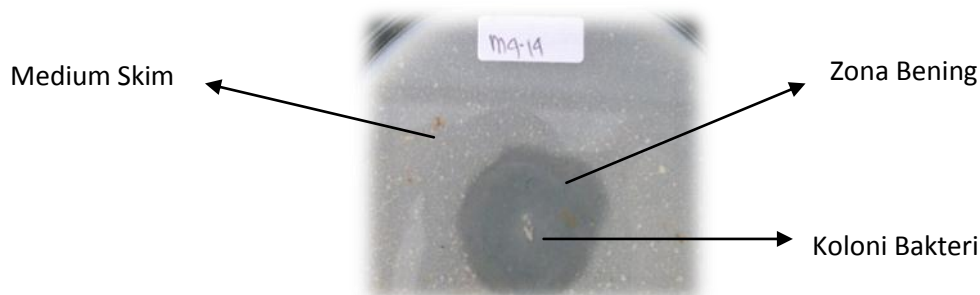
No	Lokasi sampel air panas	Jumlah isolat bakteri
1	MI (Medang Kolam I) Suhu 88°C; pH 8,45*	7
2	MII (Medang Kolam II) Suhu 77°C; pH 8.57*	3
3	MIII (Medang Kolam III) Suhu 45°C; pH8.54*	5
4	MIV (Medang Kolam IV) Suhu 83°C; pH8.62*	10
5	MV (Medang Kolam V) Suhu 86°C; pH 8,71	3
Jumlah Total Isolat		28

Keterangan : (*) : Sumber Wahyuna (2012).

Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Protease Netral.

Isolat - isolat bakteri yang diperoleh pada tahap isolasi, selanjutnya ditapis untuk menghasilkan enzim protease netral, dari 28 isolat bakteri termofilik (Tabel 1), 10 isolat yang berpotensi menghasilkan protease

netral (Tabel 2). Nilai indeks proteolitik yang dihasilkan dari isolat bakteri berkisar antara 0,27 - 3,89. Hal ini ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni yang tumbuh pada medium skim agar. Bentuk koloni bakteri dapat dilihat pada (Gambar 1).

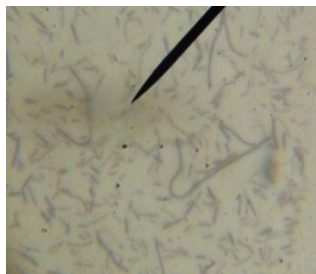


Gambar 1. Koloni isolat bakteri MIV-14 dengan zona bening.

Menurut Sastramihardja (1998) *cit* Kurniawan (2011) apabila di sekitar koloni terdapat daerah zona bening ≥ 2 cm, maka dapat dikatakan bakteri tersebut termasuk galur yang baik untuk menghasilkan enzim protease. Terbentuknya zona bening disebabkan oleh bakteri mensekresikan protease netral ke lingkungannya sehingga protein susu akan terhidrolisis dan menyebabkan di sekitar koloni menjadi bening.

Karakterisasi dilakukan pada bakteri yang berpotensi menghasilkan enzim protease netral dengan mengamati bentuk makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia sel bakteri. Karakterisasi makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia yang diperoleh untuk semua isolat pada umumnya memiliki bentuk bundar, tepian berombak, berlekuk, dan licin, warna koloni putih, mikroskopis berbentuk basil, gram positif yang ditunjukkan pada (Gambar 2), menghasilkan endospora dan bersifat motil. Positif

terhadap uji katalase, gelatin dan uji sitrat (Tabel 3).



Berdasarkan ciri-ciri makroskopis, mikroskopis, serta uji biokimia yang telah dilakukan terhadap keseluruhan isolat bakteri penghasil enzim protease netral tersebut mengarah pada genus *Bacillus*.

Gambar 2. Mikroskopis isolat MIV-14 setelah diwarnai dengan pewarnaan gram.

Tabel 2. Indeks proteolitik masing-masing isolat bakteri sumber air panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi.

No	Kolam	Kode isolat penghasil proteolitik	Hasil		Indeks Proteolitik (IP)	Jumlah Isolat penghasil protease netral
			D. Zona Bening	D. Koloni		
1		MI-1	9,94	3,54	1,81	
2		MI-2	-	-	-	
3		MI-3	-	-	-	
4	I	MI-4	-	-	-	1
5		MI-5	-	-	-	
6		MI-6	-	-	-	
7		MI-25	-	-	-	
8		MII-26	19,40	9,58	1,03	
9	II	MII-27	-	-	-	1
10		MII-28	-	-	-	
11		MIII-20	27,04	10,62	1,55	
12		MIII-21	8,45	3,05	1,77	
13	III	MIII-22	-	-	-	2
14		MIII-23	-	-	-	
15		MIII-24	-	-	-	
16		MIV-12	3,79	2,99	0,27	
17		MIV-14	23,50	4,81	3,89	
18		MIV-15	20,92	12,89	0,62	
19		MIV-16	15,62	5,38	1,9	
20	IV	MIV-7	-	-	-	4
21		MIV-8	-	-	-	
22		MIV-9	-	-	-	
23		MIV-10	-	-	-	
24		MIV-11	-	-	-	
25		MIV-13	-	-	-	
26		MV-17	17,18	5,84	1,94	
27	V	MV-18	15,13	6,12	1,47	2
28		MV-19	-	-	-	
Jumlah isolat penghasil enzim protease netral						10

Keterangan: MI-1: Kode Isolat, M (Medang), I (Kolam Pertama), 1 (Nomor isolat), (-) isolat yang tidak menghasilkan enzim protease netral.

Tabel 3. Karakterisasi makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia isolat bakteri termofilik penghasil protease netral.

No	Pengamatan	Kode Isolat									
		MI-1	MII-26	MII-20	MIII-21	MIV-12	MIV-14	MIV-15	MIV-16	MV-17	MV-18
Makroskopis											
1	Bentuk	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar	Bundar
2	Tepian	Berombak	Berombak	Berlekuk	Berlekuk	Berombak	Licin	Berombak	Licin	Licin	licin
3	Elevasi	Cembung	Datar	Cembung	Cembung	Datar	Datar	Datar	Timbul	Datar	Datar
5	Warna	Putih	Agakkekuningan	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih
Mikroskopis											
6	Bentuk	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
7	Gram	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
8	Endospora	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
9	Motilitas	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Uji biokimia											
10	Ujikatalase	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
11	UjiSitrat	Positif	Positif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Positif	Positif	Negatif	Negatif
12	Uji gelatin	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan :

1. Didapatkan 28 isolat bakteri termofilik dengan 10 isolat bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan enzim protease netral dengan indeks proteolitik berkisar antara 0,27 - 3,89. Isolat MIV-14 merupakan isolat yang memiliki nilai indeks proteolitik tertinggi yaitu 3,89.
2. Isolat pada umumnya memiliki bentuk bundar, tepian berombak, berlekuk, dan licin, warna koloni putih, mikroskopis berbentuk basil, mempunyai endospora dan bersifat motil, positif terhadap uji katalase, gelatin dan uji sitrat.

Ucapan Terima kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr. Nasril Nasir, Dr. Phil. Nat. Periadnadi dan Dr Efrizal yang telah memberikan saran dan kritik.

Daftar Pustaka

- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS. Bandung.
- Atlas, R.M and Ronald, 1997. *Principles of Microbiology*, The 2nd Ed., WBC Mc Grow-Hill Book New York.
- Benerjee, U.C., R.K. Sani., W. Azmi, and R. Soni. 1999. Thermostable Alkaline Proteases from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *Prosess Biochemistry*, **35**: 213-219.
- Dirnawan, H., A. Suwanto, dan T. Purwadaria. 2000. Eksplorasi Bakteri Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraselluler dari Sumber Air

- Panas Gunung Pancar. *Hayati*, **7**: 52-55.
- Kumar, S. And R. Nussinov. 2001. How do Thermophilic Protein deals with heat? A review. *Cell molecular life science*, **58**: 1216-1233.
- Kurniawan, H.M. 2011. *Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Kabupaten Kerinci, Jambi*. Tidak dipublikasikan. Pasca Sarjana Universitas Andalas. Padang.
- Madigan, M.T.J., M. Martinko, and J. Parker. 2000. *Biology of Microorganisms*. The 9th Ed. Prentice Hall International, Inc. New Jersey.
- Rahayu, U. 2007. *Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Protease, Buletin Teknisi Litkayasa Akuakultur*, **6, 2**: 146.
- Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Gahtge, and V.V, Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease. *Microbiology Biology Review*, **62**: 597-635.
- Suhartono, M.T. 1991. *Protease*, PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Wahyuna, D. 2012. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termo-Proteolitik dari Sumber Air panas Sungai Medang*. Universitas Andalas. Skripsi Sarjana Universitas Andalas. Padang.
- Ward, O. P and Fogarty W. M, 1983. *Proteinase. Microbial Enzyme and Biotechnology*. Applied Science Publisher. New York