

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Alkali-Proteolitik Sumber Air Panas Semurup Kerinci Jambi

Isolation and Characterization of Thermo-proteolytic Alkali Bacteria From Hot Springs at Semurup, Kerinci Jambi

Yurike Nova Edlin^{1*)}, Anthoni Agustien¹⁾, dan Djong Hon Tjong²⁾

¹⁾Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Andalas, Padang 25163

²⁾Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Andalas, Kampus UNAND Limau Manis Padang-25163

^{*)}Koresponden : yurikenova@gmail.com

Abstract

Thermophile protease has economic value because this enzyme is useful on all kind of industry that used high temperature on it production process. In the effort of obtaining indigenous alkaline thermostable a protease bacterial that produce we explore potential hot spring at Semurup, Kerinci Jambi. This study was conducted from September 2013 to February 2014, Water samples were collected by purposive sampling, the character of thermophilic bacteria were described for each in laboratory of microbiology and biomolecular, development of biology, faculty of mathematic and natural science Andalas university, Padang. There were 40 thermophile colonies, 7 isolates showed alkali proteolytic index range from 0.3 to 2.00. SIII-10 isolate showed the highest in alkali proteolytic index. The characteristic of SIII-10 are: white and bolt colony, gram negative, motil, positive sitrat agar and positive gelatin.

Key words, Isolation, characterization, alkaline protease, thermostable, Hot spring.

Pendahuluan

Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena banyak diaplikasikan pada berbagai industri. Industri-industri pengguna protease diantaranya ialah industri detergen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan limbah (Moon and parulekar, 1990). 60% enzim protease digunakan dari total enzim yang diperjual belikan di seluruh dunia (Ward, 1985). Nilai perdagangan enzim dunia mencapai 3-4 miliar dolar pertahun, 4-5 juta dolar di antaranya dari pasar Indonesia yang keseluruhannya diimpor dari negara produsen enzim (Rajasa, 2003). Enzim tersebut mempunyai nilai ekonomis dan peranan yang sangat besar, maka sampai sekarang penelitian tentang mikroorganisme penghasil enzim protease alkali masih berlangsung,

terutama mencari strain-strain baru dengan cara mengisolasi mikroorganisme penghasil enzim protease dari berbagai tempat.

Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan, karena pertumbuhan cepat dan dapat tumbuh pada substrat yang murah. Mikroorganisme termofilik menjadi pilihan yang baik sebagai sumber enzim termostabil yang aktif dan stabil pada suhu yang lebih tinggi. Sehingga perlu dilakukan eksplorasi mikroorganisme termofilik yang menghasilkan enzim alkali protease dari sumber air panas. Sumber air panas yang basa kaya dengan mineral sangat dibutuhkan oleh mikroorganisme termofilik (Cowan, 1992 *cit.* Wahyuntari, 2001). Edwards (1990) melaporkan bahwa mineral yang terkandung pada sumber air panas memungkinkan mikroorganisme termofilik dapat hidup dan bertahan hidup. Kondisi

lingkungan yang ekstrim tersebut sangat potensial dieksplorasi untuk mendapatkan jenis bakteri termofilik yang dapat menghasilkan enzim alkali protease.

Isolasi dan karakterisasi bakteri Alkali protease sangat diperlukan untuk membantu informasi awal untuk mengetahui genus, spesies bahkan galurnya. Karakterisasi pada metode fenotipik yaitu morfologi sel, analisis produk fermentasi, aktivitas enzim, kemampuan memfermentasi beberapa substrat masih dilakukan untuk klasifikasi jenis mikroorganisme berdasarkan morfologi dan fisiologi (Suwanto, 1994). Penelitian ini menggunakan isolat yang diisolasi dari sumber air panas semurup. Dengan suhu kolam air panas berkisar antara 50-78°C dengan kisaran pH 8-8,7 termasuk air panas yang bersifat basa, tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat bakteri termofilik yang menghasilkan enzim protease alkali dan mengetahui karakter isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Semurup.

Metode Penelitian

Pengambilan sampel air panas

Sampel air diambil dari sumber air panas semurup yang berada dekat dengan kota Sungai Penuh, provinsi Jambi, disekelilingnya terdapat beberapa vegetasi seperti lumut, rumput-rumputan dan memiliki empat kolam. Sampel air diambil pada empat kolam dan menggunakan botol steril 100 ml pada 10 cm dibawah permukaan air yang bersuhu antara 50 °C-78 °C selanjutnya sampel disimpan pada wadah dan dibawa segera ke laboratorium sebelum 12 jam, selanjutnya dilakukan isolasi bakteri dengan menggunakan metode *pour plate* pada medium NA (Nutrien Agar) yang diambil 1 ml dari sampel air panas, untuk masing-masing kolam dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 24 jam.

Skrining bakteri

Koloni yang tumbuh direinokulasikan pada media yang baru. Setiap koloni berbeda yang diperoleh direinokulasikan dengan metode

kuadran pada medium SMA (*Skim Milk Agar*) dengan pH media 9 dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 24 jam. Dihitung indeks proteolitiknya. Pengamatan morfologi yang dilakukan terhadap isolat yang mempunyai zona bening secara antara lain : pengamatan bentuk sel, pewarnaan gram, pewarnaan endospora, warna koloni, ukuran koloni, dan tipe koloni. Selain itu uji biokimia yang juga dilakukan adalah uji katalase, gelatin, simon sitrat agar. Kemudian hasil analisis disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Semurup, kabupaten Kerinci, Jambi, didapatkan 40 koloni bakteri. Setiap koloni yang di dapatkan mempunyai bentuk koloni yang berbeda dan berasal dari kolam yang berbeda (Tabel 1). Kolam satu bersuhu 81°C, diperoleh lima isolat bakteri termofilik, dari kolam dua bersuhu 82°C diperoleh empat isolat bakteri, dari kolam tiga bersuhu 66°C diperoleh 11 koloni bakteri, dan dari kolam empat bersuhu 66 °C diperoleh 20 koloni bakteri. Kolam dengan suhu 66°C didapatkan 31 isolat bakteri termofilik atau sekitar 77% dibandingkan dari pada kolam yang bersuhu sekitar 81°C sampai 82°C hanya didapatkan 9 isolat bakteri termofilik (23%). Lebih banyaknya isolat yang terdapat pada suhu 66 °C, menunjukkan bahwa suhu mempengaruhi keanekaragaman bakteri termofilik, hal ini kemungkinan faktor suhu tersebut mendekati "*thermophile boundary*"

Mikroorganisme termofilik banyak ditemukan pada lingkungan dengan interval suhu 50-60°C yang disebut "*thermophile boundary*" (Brock, 1986). Beberapa bakteri termofilik telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia. Sari (2012) ,melaporkan 70 isolat bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas sungai Medang, Kerinci, dengan suhu kolam 70 °C.

Penapisan Bakteri Alkali Proteolitik

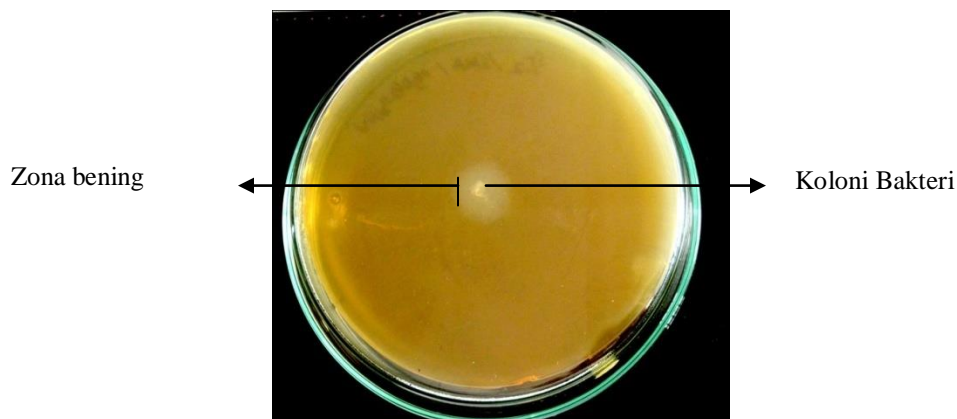
Penapisan bakteri termofilik penghasil protease alkali asal sumber air panas Semurup, kabupaten Kerinci, Jambi dilakukan dengan cara menumbuhkan semua bakteri termofilik bakteri dalam media padat yang mengandung *Skim Milk Agar* dengan

pH media 9 kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam hingga 48 jam. Koloni yang tumbuh diatas media selektif dan membentuk zona bening disekitar koloni merupakan koloni bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan enzim alkali proteolitik (Gambar 1).

Tabel 1. Isolat bakteri protease alkali termofilik yang didapatkan di sumber air panas dengan pH Media 9

No	Kolam	Suhu Kolam	Jumlah Isolat	Kode Isolat
1	I	81°C	5	SI-1, SI-2, SI-3, SI-4, SI-5
2	II	82°C	4	SII-6, SII-7, SII-8, SII-9
3	III	66°C	11	SIII-10, SIII-11, SIII-12, SIII-13, SIII-14, SIII-15, SIII-16, SIII-17, SIII-18, SIII-19, SIII-20
4	IV	66°C	20	SIV-21, SIV-22, SIV-23, SIV-24, SIV-25, SIV-26, SIV-27, SIV-28, SIV-29, SIV-30, SIV-31, SIV-32, SIV-33, SIV-34, SIV-35, SIV-36, SIV-37, SIV-38, SIV-39, SIV-40

Keterangan: S1 merupakan kode isolat untuk sampel pada sumber air panas Semurup pada kolam pertama, SII: Kode isolat bakteri pada kolam kedua, SIII: Kode isolat bakteri pada kolam ketiga, SIV: kode isolat bakteri pada kolam keempat. 1 sampai 40 menunjukkan nomor koloni.



Gambar 1. Koloni bakteri dan zona bening isolat SIII-10 pada medium susu skim (pH 9) setelah diinkubasi pada suhu 50 °C selama 24 jam

Hasil penapisan yang telah dilakukan pada semua bakteri termofilik didapatkan tujuh isolat bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan enzim alkali-proteolitik. Pada kolam pertama dengan suhu 81°C, pH 7 didapatkan dua isolat yaitu SI-2 diameter zona bening 14 mm dan isolat SI-3 diameter zona bening 7 mm. Pada kolam kedua, dengan suhu 82°C didapatkan satu isolat yaitu isolat SII-6 diameter zona bening 11 mm. Pada kolam ketiga dengan suhu 66 °C didapatkan 3 isolat yaitu isolat SIII-10 diameter zona bening 9 mm, SIII-12 diameter

zona bening 12 mm, SIII-16 diameter zona bening 7 mm. Pada kolam keempat, dengan suhu 66 °C didapatkan satu isolat yaitu Isolat SIV-22 diameter zona bening 8 mm.

Terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada medium padat yang mengandung kasein karena adanya biosintesis enzim protease alkali dalam sel, kemudian mensekresikannya ke lingkungan, sekresi tersebut menghidrolisis protein susu pada media lalu menjadi asam-asam amino yang menyebabkan perubahan warna dari putih kecoklatan menjadi tidak berwarna. Menurut

Rilda dan Agustien (2004), adanya perbedaan zona bening pada setiap isolat, disebabkan oleh aktivitas enzim dari masing-masing isolat yang disekresikan ke medium berbeda.

Aktivitas enzim tersebut ditentukan oleh konsentrasi, konformasi, urutan asam amino dan jenis asam amino

Tabel. 2 Nilai Indeks Alkali Proteolitik Isolat Bakteri Alkali Proteolitik

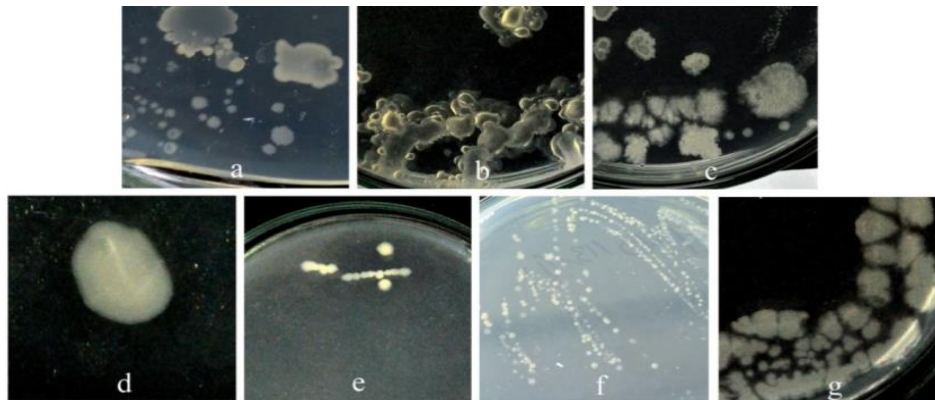
No	Kolam	Suhu	Kode Isolat	Diameter Koloni(mm)	Diameter Zona Bening(mm)	IP (mm)
1	1	81°C	SI-1	0	0	0
2	1	81°C	SI-2	4	14	2,5
3	1	81°C	SI-3	4	7	0,75
4	1	81°C	SI-4	0	0	0
5	1	81°C	SI-5	0	0	0
6	2	82°C	SII-6	8	11	0,375
7	2	82°C	SII-7	0	0	0
8	2	82°C	SII-8	0	0	0
9	2	82°C	SII-9	0	0	0
10	3	66°C	SIII-10	3	9	2
11	3	66°C	SIII-11	0	0	0
12	3	66°C	SIII-12	9	12	0,33
13	3	66°C	SIII-13	0	0	0
14	3	66°C	SIII-14	0	0	0
15	3	66°C	SIII-15	0	0	0
16	3	66°C	SIII-16	4,5	7	0,55
17	3	66°C	SIII-17	0	0	0
18	3	66°C	SIII-18	0	0	0
19	3	66°C	SIII-19	0	0	0
20	3	66°C	SIII-20	0	0	0
21	4	66°C	SIV-21	0	0	0
22	4	66°C	SIV-22	6	8	0,33
23	4	66°C	SIV-23	0	0	0
24	4	66°C	SIV-24	0	0	0
25	4	66°C	SIV-25	0	0	0
26	4	66°C	SIV-26	0	0	0
27	4	66°C	SIV-27	0	0	0
28	4	66°C	SIV-28	0	0	0
29	4	66°C	SIV-29	0	0	0
30	4	66°C	SIV-30	0	0	0
31	4	66°C	SIV-31	0	0	0
32	4	66°C	SIV-32	0	0	0
33	4	66°C	SIV-33	0	0	0
34	4	66°C	SIV-34	0	0	0
35	4	66°C	SIV-35	0	0	0
36	4	66°C	SIV-36	0	0	0
37	4	66°C	SIV-37	0	0	0
38	4	66°C	SIV-38	0	0	0
39	4	66°C	SIV-39	0	0	0
40	4	66°C	SIV-40	0	0	0

Keterangan: S1 merupakan kode isolat untuk sampel pada sumber air panas Semurup pada kolam pertama, SII: Kode isolat bakteri pada kolam kedua, SIII: Kode isolat bakteri pada kolam ketiga, SIV: kode isolat bakteri pada kolam keempat. 1 sampai 40 menunjukkan nomor koloni.

Tabel 3. Karakter Makroskopis dan Uji Biokimia isolat Protease Alkali

No	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Elevasi	Tepian	Endo spora	Gel atin	Sitrat Agar	Katal ase	Motil itas
1	Putih susu	Bulat	datar	Licin	+	+	+	+	+
2	Putih susu	Bulat	cembung	Licin	+	-	+	+	+
3	Putih susu	Irregular	datar	Berombak	+	+	+	+	+
4	Putih susu	Irregular	datar	Berombak	-	-	-	+	+
5	Putih susu	Irregular	berbukit	Irregular	+	-	+	+	+
6	Putih	Kompleks	berbukit	Ikal	-	+	+	+	+
7	Kuning	Bulat	cembung	Licin	+	-	-	+	+

Keterangan: S1 merupakan kode isolat untuk sampel pada sumber air panas Semurup pada kolam pertama, SII: Kode isolat bakteri pada kolam kedua, SIII: Kode isolat bakteri pada kolam ketiga, SIV: kode isolat bakteri pada kolam keempat. 1 sampai 40 menunjukkan nomor koloni. + = hasil reaksi positif, - = hasil reaksi negatif



Gambar 2. Bentuk koloni isolat Alkali proteolitik a. SIII-12, b. SIII-10, c. SIII-16, d. SI-2, e. SIV-22, f. S1-3, g. SII-6.



Gambar 3. Bentuk sel isolat SIII-10 bakteri alkali proteolitik dengan perbesaran perbesaran 400 X

Tabel 2 menunjukkan nilai indeks proteolitik masing-masing isolat. Setiap isolat memiliki nilai IP yang berbeda, indeks

proteolitik isolat berkisar dari 0,33 sampai dengan 2,5. Isolat SI-2 mempunyai nilai indeks paling tinggi, sedangkan isolat SIII-12

dan SIV-22 memiliki nilai indeks paling rendah. Aktifitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya daerah bening disekitar koloni dengan besarnya diameter koloni (Naiola dan Widhyastuti, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing isolat memiliki aktivitas enzim yang berbeda dalam proses menghidrolisis protein yang terdapat di dalam Media Skim Agar

Karakterisasi Parsial Isolat Bakteri Alkali Proteolitik

Karakterisasi parsial dilakukan terhadap isolat yang mempunyai zona bening (Tabel 3), hasil dari pengamatan makroskopis dapat dilihat pada (Gambar 2). Isolat SIII-10 memiliki bentuk koloni yang kompleks, tepian ikal, koloni tidak berwarna, elevasi berbukit, permukaan licin, positif terhadap uji katalase, uji gelatin, dan uji sitrat agar. Hasil pewarnaan Gram dari isolat bakteri yang memiliki aktivitas enzim alkali protease lima isolat merupakan gram positif, isolat SIII-12 dan SIII-10 merupakan bakteri gram negatif. Semua isolat protease alkali mempunyai sel bakteri berbentuk batang (Gambar 3).

Uji gelatin dilakukan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam menghidrolisis gelatin. Uji positif gelatinase ditandai dengan medium gelatin yang tetap cair setelah dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama satu jam. Uji positif sitrat agar ditandai dengan berubahnya warna medium dari hijau menjadi biru karena terjadi penghilangan asam dan peningkatan pH media. Menurut Vermelho, *et al.* (1996) teknik seleksi mikroorganisme proteolitik dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai media padat yang mengandung substrat protein seperti kasein, gelatin, bovin serum albumin dan hemoglobin. Karena kemampuan suatu strain bakteri dalam menghasilkan protease sangat bervariasi tergantung dari komposisi media dan faktor lingkungan lainnya (Naiola dan Widhiyastuti, 2002)

Kesimpulan

Diperoleh 7 isolat protease alkali termofilik dari sumber air panas Semurup, Kerinci, Jambi. Isolat dengan indeks Proteolitik terbaik adalah isolat SIII-10 dengan indeks Proteolitik 2,00. Karakterisasi dari isolat SIII-10 yang berpotensi sebagai penghasil alkali proteolitik mempunyai bentuk koloni kompleks, tepian ikal, koloni tidak berwarna, elevasi berbukit, permukaan licin, positif terhadap uji katalase, uji gelatin, dan uji sitrat agar.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Dr. Phil.nat Nurmiati, Dr. Syaifullah, Drs Suwirman M.Si, Dr. Fuji Astuti Febria yang telah memberikan saran dan kritik untuk penulisan artikel. Penelitian ini didanai oleh program PKMP DIKTI 20013/2014.

Daftar Pustaka

- Brock, T.D. 1986. *Introduction: An Overview of the Thermophiles: general, Molecular and Applied Microbiology*. Ed. T.D. Brock, A Wiley Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York.
- Cowan, D. 1992. *Biochemistry and Molecular Biology of the Extremely Thermophilic Archaeobacteria*, in : *Molecular Biology and Biotechnology Extremophiles*. Ed.R.A. Herbert and R.J.Sharp, Blackie and Sons. New York.
- Edwards, C. 1990. *Thermophiles in: Microbiology of Extreme Environments*. Graw-Hill Publ. Company. New York.
- Moon, S. H, dan S.J Parulekar. 1990. A parameter studi of protease production in batch and fed batch cultures of *Bacillus*. *Biotech, Bioeng.*, 37, 467-483
- Naiola E dan Wihyastuti N. 2002. *Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi*

- Protease dari beberapa Isolat Bakteri.
Berita Biologi, 16 (3): 467-473.
- Rajasa, H. 2003. *Pidato Pembukaan 3rd conference on Industrial Enzyme and Biotechnology. Technology and bussines Opportunity for Industrial Enzyme in harmony with Enviroment.* BPPT. Jakarta, 6-7 Oktober 2003.
- Rilda, Y, dan Anthoni Agustien. 2004. Eksplorasi Bakteri-Bakteri Isolat Lokal Penghasil Enzim Serin-Alkali Protease. *Jurnal Kimia Andalas*, 10 (1) : 37-43-2004.
- Sari. U. M. 2013. *Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Selulolitik Termofilik Sumber Air Panas Sungai Medan Kerinci Jambi.* Skripsi Sarjana Biologi. Universitas Andalas. Padang.
- Suwanto, A. 1994. Evolusi microbe dan kaitannya dengan sistematik molekuler. *Hayati*, 1, 2, 26-31.
- Vermelho, A. B., M.N.L. Meirelles, A. Lopes, S.D.G. Petinate, A.A. Chaia, M.H. Branquinha. 1996. Detection of extracellular protease from microorganism on agar plates, <http://www.bioline.org.br>
- Wahyuntari, B. 2001. *Pemurnian dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler Isolat Prokaroit Termofilik Ekstrim dari Tangkuban Perahu.* Disertasi, IPB, Bogor
- Ward, O. P. 1983. *Proteinase.* Di dalam *Microbial Enzyme And Biotechnology.* W. M.Fogarty. Applied Science Publisher. New York.