

ISOLASI DAN OPTIMASI EKSTRINSIK BAKTERI TERMO-PROTEOLITIK ISOLAT SUMBER AIR PANAS SEMURUP, KAB. KERINCI, JAMBI

ISOLATION AND EXTRINSIC OPTIMATION OF TERMO-PROTEOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM SEMURUP HOT SPRING, DISTRICT OF KERINCI, JAMBI

Hafiz Muchti Kurniawan¹,

¹Program Studi Farmasi Universitas Adiwangsa Jambi

*Korespondensi Author : hafezkurniawan84@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri termo-proteolitik telah diisolasi dari sumber air panas semurup kerinci, Jambi. Bakteri yang diisolasi berjumlah 120 isolat dan 50 isolat diantaranya mampu memproduksi enzim protease termostabil. Isolat dengan kode TPT-20 menunjukkan nilai indeks proteolitik yang paling tinggi yaitu sebesar 13. Hasil identifikasi dan karakterisasi makroskopis, mikroskopis dan biokimia menunjukkan bahwa ciri-ciri isolate TPT-20 mengarah kepada genus *Bacillus*. Rekayasa kondisi ekstrinsik dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kondisi optimal *Bacillus sp.* TPT-20 dalam memproduksi enzim protease. Optimasi dilakukan dengan merekayasa kondisi suhu dan pH pertumbuhan, sumber glukosa, sumber nitrogen, rasio C/N, Konsentrasi inoculum, jenis medium, dan waktu inkubasi. Hasil optimasi menunjukkan bahwa dengan suhu inkubasi 55 0C, pH medium 8, penambahan maltose 1,5 %, penambahan KNO₃ dengan rasio C/N = 10, konsentrasi inoculum 7,5 % pada medium el-refai dan waktu inkubasi 12 jam dapat meningkatkan produksi enzim protease termostabil dengan nilai aktivitas sebesar 5,009 U/mg

Kata Kunci : *Termo-Proteolitik, Bacillus sp, optimasi ekstrinsik, sumber air panas*

ABSTRACT

Termo-proteolytic bacteria was isolated from the hot spring of Semurup Kerinci, Jambi. Isolated bacteria consist of 150 isolate and 50 of them indicated to produce termostabil protease enzyme. The isolate with isolate code TPT-20 has value of proteolytic index highest which is 13. The result of identification and macroscopic characterization, microscopic and biochemistry assays was showed that TPT 20 toward genus of Bacillus. The culture condition was done to get optimal condition to producing termostabil protease enzyme. The optimization was done with respect to temperature and pH, glucose sources, nitrogen sources, C/N Ratio, inoculum concentration, the kind of medium, and incubated time. The results of optimization were the best enzyme production obtained in initial Temperature 55 0C at pH 8, 1,5 % maltose and added C/N ratio = 10 KNO₃. 7,5 % inoculum concentration in el-refai medium for 12 hours able to increase protease production until with specific activity 5,0009 U/mg.

Keywords : *Termo-proteolytic, Bacillus sp., optimasi extrinsic, hot spring*

PENDAHULUAN

Protease (E.C.3.4) merupakan enzim golongan hidrolase yang berperan dalam reaksi pemecahan ikatan peptida pada molekul protein (Ward, 1983). protease merupakan satu dari tiga kelompok enzim terbesar dari industry enzim dan diperkirakan 60 % dari total produksi enzim yang diperdagangkan di

seluruh dunia (Nascimento dan Martin, 2004)

Protease banyak digunakan pada beberapa aplikasi industri seperti industri detergen, farmasi, penyamakan kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein dan proses pengolahan limbah industri (Nascimento dan Martin, 2004). Protease juga banyak diaplikasikan sebagai enzim

pembersih kontak lensa (contact lens) Selain itu protease banyak diterapkan dalam hidrolisis lapisan gelatin pada film sinar-X dalam dunia kesehatan.

Pada beberapa dekade terakhir ini, enzim yang stabil pada kondisi ekstrim terutama pada suhu tinggi makin dicari khususnya protease yang banyak diminati oleh kalangan industri karena penerapannya yang begitu luas (Purwadaria et al, 2000)

Pada suhu tinggi, resiko kontaminasi berkurang dan laju reaksi berjalan lebih cepat sehingga prosesnya dirasa makin efisien. selain itu enzim yang tahan panas pada suhu tinggi (termostabil) telah menjadi pusat perhatian banyak peneliti karena struktur dan sifatnya yang unik (Kim, Yang, Kim, 2003). memproduksi enzim yang mempunyai aktivitas yang tinggi sehingga dapat digunakan dalam aplikasinya haruslah dilakukan dengan rekayasa kondisi optimal bagi pertumbuhan mikroorganisme itu sendiri (Suhartono, 1991).

Peningkatan produksi enzim bisa dilakukan dengan rekayasa pada komposisi medium, pH medium, suhu, sumber karbon dan sumber nitrogen (Sumantha, Laroche, and Pandey, 2006). Oleh sebab itu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui kondisi optimum bakteri termo-proteolitik asal isolat semurup Kerinci, Jambi dalam memproduksi enzim protease.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dilakukan penulis bersifat deskriptif dan eksperimental. Metode diawali dengan pengambilan sampel di sumber air panas Semurup, Isolasi dan skrinning bakteri penghasil protease termostabil, dan optimasi lingkungan ekstrinsik bakteri penghasil protease termostabil.

Pengambilan sampel dan pengukuran pH

Metode penelitian ini bersifat deskriptif dengan cara sampel air panas diambil dari kawasan sumber air panas Semurup Kabupaten Kerinci Provinsi Jambi dengan menggunakan botol sampel steril 250 ml. Kemudian dilakukan pengukuran terhadap sifat fisika sampel air panas seperti suhu, pH, warna tanah, kejernihan air serta vegetasi tumbuh yang berada disekitar lokasi pengambilan sampel air panas. Kemudian sampel air panas di simpan didalam termos dan dibawa langsung ke laboratorium dan dianalisa sebelum 24 jam dari pengambilan sampel air. Kandungan kimia dari sampel air yang dianalisis meliputi nitrat, sulfit, kalsium, magnesium dan besi.

Isolasi dan Skrinning Bakteri Termo-Proteolitik

Isolasi bakteri termo-proteolitik dilakukan dengan cara sebanyak 1 ml sampel air panas disebar pada cawan petri yang berisi medium Nutrien Agar (NA) dan medium Pepton Water (PW) dengan komposisi NaCl 0,5 % dan pepton 5 %. Kemudian Sampel dimasukkan kedalam termos lalu dibawa ke laboratorium dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 48 jam. Setelah 2 hari koloni yang tumbuh dipindahkan kedalam medium NA yang baru. Skrinning dilakukan dengan menumbuhkan semua koloni yang tumbuh kedalam medium Skim Milk Agar (SMA) kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C selama 2 hari. Bakteri yang membentuk zona bening dan diameter koloni diukur indeks proteolitik (IP). Rumus penghitungan IP dapat dilihat pada gambar 1. Isolat dengan IP tertinggi diduga sebagai isolat yang potensial untuk di optimasi lebih lanjut.

$$\text{Indeks Proteolitik (IP)} = \frac{D1 - D2}{D2}$$

Gambar 1. Rumus penghitungan Indeks Proteolitik

D1 = diameter zona bening

D2 = diameter koloni

Persiapan Inokulum

Isolat dengan IP tertinggi ditumbuhkan kedalam 25 ml medium basal lalu di inkubasi pada suhu 50 °C selama 24 jam dan di shaker dengan kecepatan 150 rpm.

Isolasi enzim protease dan uji aktivitas protease

Isolasi protease dilakukan dengan 2,5 ml isolat bakteri diinokulasikan kedalam 47,5 ml medium produksi pH 8. Kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C selama 24 jam, 150 rpm. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang. Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak kasar enzim protease. Uji aktivitas protease dilakukan dengan metode ward (1984) sebanyak 1 ml Casein 1 % dalam buffer posfat 50 mM, pH 8 ditambahkan kedalam 1 ml larutan enzim lalu diinkubasi 10 menit, suhu 50 °C. Sebanyak 1 ml TCA 10 % ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzim. Kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit. Sentrifugasi 10000 rpm selama 20 menit. Sebanyak 0,5 ml Na₂CO₃ 0,5 M ditambahkan 1 ml pereaksi Folin ciocalteu's ditambahkan kedalam supernatan yang terbentuk. Inkubasi 20 menit pada suhu 55 °C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Aktivitas enzim ditentukan dengan menginterpolasikan nilai absorbansi kedalam persamaan regresi pada kurva standar tirosin.

Optimasi ekstrinsik medium pertumbuhan bakteri termo-proteolitik

Penentuan Efek suhu dan pH optimum

Untuk mengoptimalkan kondisi pertumbuhan bakteri dalam memproduksi protease dilakukan dengan memvariasikan suhu (45 °C, 50 °C, 55 °C,

60 °C) dan pH medium (7, 8, 9, 10). Parameter yang diamati adalah aktivitas spesifik enzim (Unit/mg)

Penentuan Efek konsentrasi dan Sumber karbon

Penentuan efek konsentrasi dan sumber karbon dilakukan dengan memvariasikan sumber karbon (Maltosa, Glukosa, Laktosa, Sukrosa) dan Konsentrasi sumber karbon dalam medium (0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %). Parameter yang diamati adalah aktivitas spesifik enzim dengan satuan (unit/mg)

Penentuan Efek sumber nitrogen dan rasio C/N

Penentuan efek sumber nitrogen dan rasio C/N dilakukan dengan memvariasikan sumber Nitrogen (KNO₃, NaNO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄) dan rasio C/N dalam medium (5, 10, 15, 20). Parameter yang diamati adalah aktivitas spesifik enzim dengan satuan (unit/mg)

Penentuan efek dosis inokulum dan jenis medium

Penentuan efek dosis inokulum dan jenis medium dilakukan dengan memvariasikan dosis inokulum (2,5 %, 5,0 %, 7,5 %) dan jenis medium (el-refai, Jhonvesly-Naik yang dimodifikasi, Casein Broth). Parameter yang diamati adalah aktivitas spesifik enzim dengan satuan (unit/mg)

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

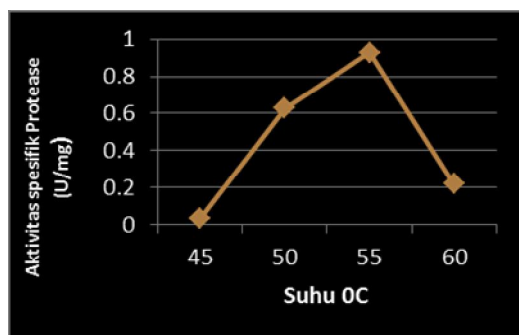
Hasil isolasi bakteri termofilik asal sumber air panas Semurup, Kerinci, Jambi berjumlah 120 isolat dan 50 isolat diantaranya mampu memproduksi enzim protease termostabil. Isolat dengan kode TPT-20 menunjukkan nilai indeks proteolitik yang paling tinggi yaitu sebesar 13. Kondisi biotik dan abiotik dilingkungan

sumber air panas menunjukkan adanya vegetasi tumbuhan seperti rumput dan dedaunan yang gugur merupakan sumber bahan organik bagi bakteri termofilik. Faktor abiotik juga berpengaruh terhadap keberadaan bakteri termofilik. Dari hasil pengukuran faktor fisika didapatkan suhu berkisar 60-89 °C, pH 3-7 dan terdapat kandungan kimiawi seperti NO₃, SO₄ Ca, Mg, Fe. Hasil identifikasi dan karakterisasi makroskopis, mikroskopis dan biokimia menunjukkan bahwa ciri-ciri isolate TPT-20 mengarah kepada genus *Bacillus*.

PEMBAHASAN

Efek suhu dan pH optimum

Suhu merupakan faktor yang paling penting dan berpengaruh terhadap produksi enzim protease. Protease diproduksi. Produksi enzim diamati berdasarkan variasi suhu (45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C). Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease disajikan pada gambar 2.

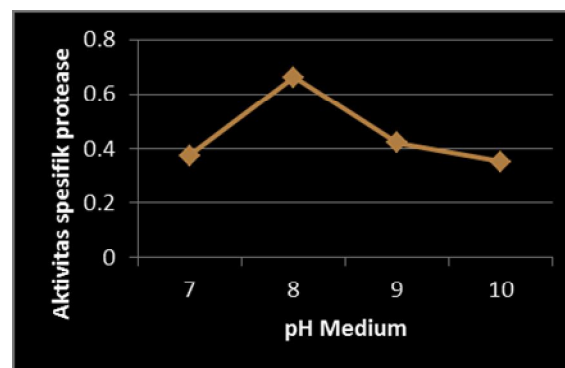


Gambar 2. Profil suhu inkubasi terhadap aktivitas spesifik protease pada pH 8

Berdasarkan gambar 2 di atas diketahui bahwa produksi optimum protease oleh *Bacillus sp.* TPT-20 pada suhu 55 °C dengan nilai 0,929 U/mg dan laju reaksi enzimatik mengalami penurunan pada suhu di atas 55 °C bahkan bisa mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya. Penelitian yang dilakukan Naiola dan Widyastuti (2007) melaporkan bahwa *Bacillus sp.* Mampu menghasilkan

protease pada rentang aktivitas 37-65 °C, laju katalitik optimum pada suhu 55 °C dan aktivitasnya menurun pada suhu di atas 55 °C hal ini disebabkan enzim mengalami denaturasi sehingga terjadi perubahan struktur dan konformasi pada suhu tinggi sehingga substrat terhambat memasuki sisi aktif enzim (Kosim dan Putra, 2010)

Seperti halnya suhu, pH merupakan faktor yang sangat penting didalam mempengaruhi laju produksi enzim protease. Profil pH medium terhadap aktivitas spesifik protease disajikan pada gambar 3.

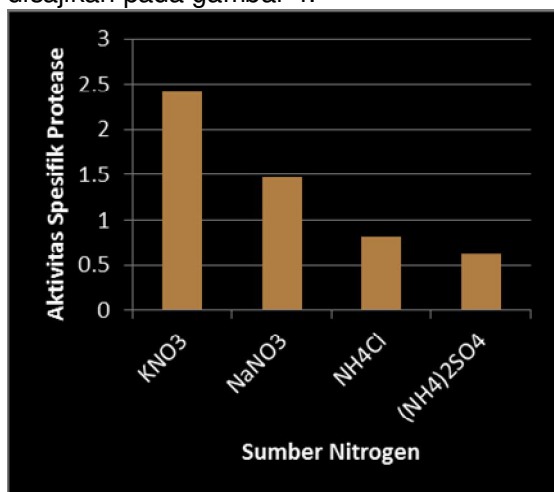


Gambar 3. Profil pH medium terhadap aktivitas spesifik protease pada suhu 55 °C

Berdasarkan gambar 3 di atas diketahui bahwa produksi optimum protease oleh *Bacillus sp.* TPT-20 pada pH 8 dengan nilai 1,304 U/mg. Sedangkan pada pH medium 10 dan suhu 45 °C menunjukkan nilai aktivitas yang paling rendah yakni 0,012 U/mg. Hal yang sama dilaporkan oleh Naiola dan Widyastuti (2007) bahwa aktivitas protease tertinggi pada pH 8 dan suhu 55 °C untuk *Bacillus sp.* yakni sebesar $1,8 \times 10^2$ U/mg dan laju reaksi enzimatik mengalami penurunan pada pH di atas 8 bahkan bisa mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya.

Efek sumber karbon dan sumber nitrogen terhadap aktivitas protease

Diantara sumber nitrogen yang digunakan KNO_3 mempunyai efek yang paling tinggi dalam meningkatkan produksi protease termostabil dan level tertinggi produksi protease dicapai ketika rasio C/N = 10. Diagram batang efek sumber nitrogen terhadap aktivitas spesifik protease disajikan pada gambar 4.

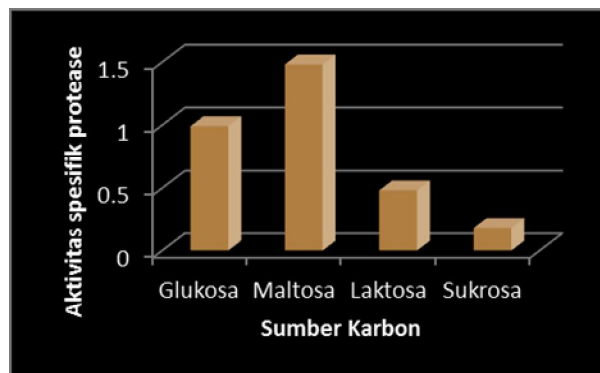


Gambar 4. Profil sumber nitrogen terhadap aktivitas spesifik protease pada rasio C/N = 10

Berdasarkan gambar 4 diatas diketahui bahwa sumber nitrogen yang mengandung garam amonium dapat menghambat pertumbuhan dan produksi protease dari *Bacillus sp.* TPT-20, hal ini sesuai dengan pendapat Nadeem, Qazi, Baig, Syed (2008) bahwa sumber nitrogen an organik yang mengandung garam amonium mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus licheniformis* N-2 . keberadaan amonium dapat menekan pertumbuhan dan biosintesis enzim yang diakibatkan adanya pelepasan amoniak yang cukup cepat dari sumber nitrogen sehingga pH menjadi rendah.

Perbedaan sumber karbon juga mempengaruhi produksi protease termostabil oleh *Bacillus sp.* TPT-20. Diantara sumber karbon yang di uji, Maltosa 1,5 % mampu memberikan hasil yang paling baik dalam memproduksi protease termostabil sebesar 1,481 U/mg. Diagram batang efek sumber karbon

terhadap aktivitas spesifik protease disajikan pada gambar 5

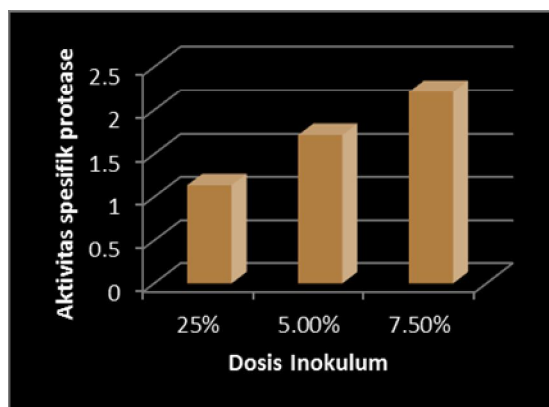


Gambar 5. Profil sumber karbon terhadap aktivitas spesifik protease pada konsentrasi 1,5 %

Dari gambar diatas pemberian laktosa dan sukrosa kurang efektif dalam memproduksi protease. Pemberian Sukrosa menghasilkan aktivitas enzim yang paling kecil yakni 0,053 U/mg. Hasil yang sama ditunjukkan dari penelitian Da silva, Delatorre, Martins (2007) dimana pati dan maltosa merupakan sumber karbon terbaik dalam memproduksi protease sedangkan laktosa dan sukrosa merupakan sumber karbon kurang efektif dalam memproduksi protease termostabil.

Efek dosis inokulum dan jenis medium terhadap aktivitas spesifik protease

Berdasarkan hasil pengamatan diketahui bahwa dosis inokulum yang paling baik dalam menghasilkan produksi protease termostabil adalah 7,5 % pada medium el-refai. Diagram batang efek dosis inokulum dan jenis medium terhadap aktivitas spesifik protease disajikan pada gambar 6



Gambar 6. Profil dosis inokulum terhadap aktivitas spesifik protease pada medium el-refai

Berdasarkan gambar 6 di atas diketahui bahwa dengan dosis inokulum 7,5 % menunjukkan aktivitas protease tertinggi. Perlakuan ini berbeda nyata bila dibandingkan dengan perlakuan lain. Hal ini disebabkan komposisi medium dan dosis inokulum memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim. Hal ini sesuai dengan penelitian shafee (2005) bahwa dosis inokulum dan komposisi medium memberikan pengaruh yang besar terhadap produksi enzim protease.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa didapatkan 120 isolat bakteri termofilik, 50 diantaranya mampu menghasilkan enzim protease termostabil. Isolat dengan kode TPT-20 menunjukkan nilai IP tertinggi yakni 13. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat TPT-20 memiliki ciri-ciri yang mengarah pada genus *Bacillus*.

Hasil optimasi ekstrinsik terhadap *Bacillus sp* TPT-20 menunjukkan bahwa dengan suhu 55 °C, pH medium 8, penambahan maltosa 1,5 %, penambahan KNO₃ dengan rasio C/N = 10, konsentrasi inokulum 7,5 % pada medium el-refai, dan waktu inkubasi 12 jam mampu meningkatkan produksi protease sebesar 5,009 U/mg

DAFTAR PUSTAKA

- Da silva, C.R., A.B. Delatorre., M. L. L. Martins. 2007. *Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic Bacillus sp and some properties of the enzymatic activity*. *Brazilian Journal of Microbiology*
- Kosim, M., S.R.Putra. 2010. Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. *Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010*. Jurusan Kimia FMIPA ITS Surabaya
- Kim, K.J.,Y.J. Yang and J.G. Kim. 2003. *Purification and characterization of chitinase from Streptomyces sp. M-20*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.36, No.2, PP.185-189
- Nadeem, M.,J.I. Qaiz, S.Baig, Q. Syed.2008. *Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by Bacillus licheniformis N-2*. *Food Technology Biotechnology*, 46, 4, 388-394
- Naiola, E. Dan N. Widyastuti. 2007. *Semipurifikasi dan karakterisasi enzim protease Bacillus sp*. *Berk. Penel. Hayati* : 13 (51-56), 2007
- Nascimento, W.C.A and M.L.L.,Martins.2004. *production and properties of an extracellular protease from thermophilic Bacillus sp*. *Brazilian Journal*, 38, 234-240
- Purwadaria, T.,A. Suwanto., H.Dirnawan. 2000. *Eksplorasi bakteri termofil penghasil enzim hidrolitik ekstraseluler dari sumber air panas gunung pancar*, *Jurnal Hayati*, Vol : 7, No. 2. Hlm 52-55
- Shafee, N.,S.N. Aris.,R.N. Rahman., M. Basri.,A.B Saleh. 2005. *Optimization of environmental and Nutritional Conditions for the production of Alkaline Protease by a Newly Isolated Bacterium Bacillus cereus Strain 146*. *Journal Applied Science Research* 1 (1):1-8

- Suhartono, M.T.1991. *Protease*, PAU Bioteknologi IPB.Bogor
- Sumantha, A.,C.Laroche, and A. Pandey. 2006. *Microbiology and industrial of food-grade protease : A perspective. Food, Technology, Biotechnology, 44,2,211-220*
- Ward, O.P. 1983. *Proteinase. Didalam Microbial enzyme and Biotechnology.* W. M. Fogarty. *Applied Science Publisher.* New York.
- Ward, O.P. 1984. *Proteolytic enzyme, coprehensive Biotechnology, 3, 781-789*