

SKRINING BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL PROTEASE

Umi Rahayu¹⁾

¹⁾ Teknisi Litkayasa Pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta

ABSTRAK

Kegiatan ini bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme yang mempunyai sifat termofilik dan kemampuan untuk memproduksi protease. Isolasi dilakukan pada sembilan contoh air laut panas yang berasal dari mata air perairan laut Poso, Sulawesi Tengah. Dalam kegiatan ini, media yang digunakan untuk isolasi bakteri termofilik penghasil protease adalah media padat yang mengandung *kalium dihydrogenphosphat* 0,008%; *ammonium sulfat* 0,04%; *magnesium sulfat* 0,01%; *natrium chlorid* 0,1%; *bacteriological pepton* 0,5%; *bacto yeast extract* 0,1%; dan *bacto agar* 2%. Sedangkan media yang digunakan untuk uji proteolitik adalah media dengan komposisi yang sama ditambah dengan skim milk 2% di mana uji proteolitik ditandai dengan terbentuknya areal bening di sekitar koloni. Tujuh dari sembilan contoh air laut panas yang diuji menghasilkan sepuluh isolat dengan kode P1-3, P1-5, P3-3, P3-5a, P3-5b, P4-1, P4-2, P5-2, P7-2, dan P7-5 yang mempunyai sifat termofilik dan kemampuan memproduksi protease. Isolat dengan kode P3-5a memperlihatkan Indeks Proteolitik tertinggi (IP)= 2,73 selama masa inkubasi 24 jam dan (IP)= 2,77 selama masa inkubasi 48 jam dengan suhu inkubasi 55°C. Hasil pewarnaan Gram dan pengamatan morfologi sel bakteri dari sepuluh isolat yang dihasilkan keseluruhannya menunjukkan bakteri termasuk kelompok Gram negatif

KATA KUNCI: air laut panas, bakteri termofilik, enzim protease

PENDAHULUAN

Mikroba termasuk ke dalam kelompok jasad hidup yang sangat peka terhadap perubahan lingkungan. Dengan adanya perubahan kecil, misalnya pada temperatur atau cahaya, akan cepat mempengaruhi kehidupan dan aktivitasnya. Perubahan terjadi di dalam lingkungan dapat mengakibatkan perubahan sifat morfologi dan sifat fisiologi mikroorganisme ini. Temperatur merupakan salah satu faktor yang penting di dalam kehidupan. Pada umumnya batas daerah temperatur bagi kehidupan mikroorganisme terletak di antara 0°C dan 90°C, sehingga untuk masing-masing mikroorganisme dikenal nilai temperatur minimum, optimum, dan maksimum. Berdasarkan daerah aktivitas temperatur, mikroorganisme dibagi menjadi tiga golongan, yaitu:

a) Mikroorganisme *psikrofil* (*kryofil*) adalah golongan mikroorganisme yang dapat tumbuh pada daerah temperatur antara 0°C sampai 30°C, dengan temperatur optimum 15°C. Kebanyakan dari golongan ini tumbuh di tempat-tempat dingin, baik di daratan ataupun di lautan.

b) Mikroorganisme *mesofil* adalah golongan mikroorganisme yang mempunyai temperatur optimum pertumbuhan antara 25°C sampai 37°C, minimum pada 15°C dan maksimum di antara 55°C.

c) Mikroorganisme *termofil* adalah golongan mikroorganisme yang dapat tumbuh pada daerah temperatur tinggi, optimum 55°C sampai 60°C, minimum pada 40°C, sedangkan maksimum pada 75°C. Golongan ini terutama terdapat di dalam sumber-sumber air panas dan tempat-tempat lain yang bertemperatur lebih tinggi dari 55°C. (Suriawiria, 1996)

Mikroba termofilik adalah mikroorganisme yang mampu tumbuh pada lingkungan suhu tinggi. Enzim termostabil yang diproduksi oleh mikroba termofilik merupakan jenis enzim yang banyak digunakan dalam proses industri pangan, farmasi dan obat-obatan. Telah diketahui bahwa bakteri termofilik merupakan sumber enzim dengan sifat-sifat unik sehingga menarik kalangan industri untuk mengaplikasikannya (Thamrin, 2001). Enzim ini tahan pada suhu tinggi, pH ekstrim, kandungan garam

tinggi, pelarut organik dan senyawa pendenaturasi. Aplikasi enzim termostabil pada industri pangan memberikan beberapa keuntungan, antara lain pada suhu tinggi reaksi berlangsung lebih cepat, risiko kontaminasi dapat ditekan, viskositas larutan berkurang sehingga mengurangi energi untuk agitasi, daya ionisasi dan daya kelarutan meningkat dan biaya pendinginan dapat ditekan sehingga potensial untuk produksi skala besar (Edwards, 1990 dalam Thamrin, 2001).

Semua enzim adalah protein yang dapat diperoleh dari sumber daya hayati tanaman, hewan dan mikroorganisme. Mikroorganisme mulai dari makhluk uniseluler, sangat potensial sebagai penghasil enzim yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme mempunyai beberapa keunggulan bila dibandingkan dengan protease dari sumber lainnya, yaitu: dapat diproduksi dalam jumlah besar, produktivitasnya mudah ditingkatkan, mutu lebih seragam, harga lebih murah, dapat ditumbuhkan dengan cepat, pertumbuhannya mudah diatur, enzim yang dapat dicapai dalam jumlah yang ekonomis untuk industri dan isolasinya mudah dilakukan. Aplikasi pemanfaatan enzim dalam berbagai bidang industri antara lain karena enzim mempunyai keuntungan-keuntungan sebagai berikut: enzim merupakan bahan alami yang tidak beracun, dapat mempercepat reaksi tanpa menyebabkan terbentuknya hasil reaksi yang tidak diinginkan, kecepatan reaksi dapat diatur dengan mengatur pH, suhu dan jumlah enzim yang digunakan, aktif pada konsentrasi rendah, dapat diinaktifkan sesuai yang dikehendaki dan merupakan senyawa alamiah yang bersifat *biodegradable* serta ramah lingkungan (Hartono, 1995). Protease adalah enzim yang mengkatalis hidrolisis molekul protein. Enzim ini berperan penting dalam metabolisme sel dan proses regulasi. Dalam industri pangan, protease dimanfaatkan untuk pengolahan susu, roti, biskuit, proses pematangan keju, pengempukan daging, *debittering*, dan pembuatan produk dari kedelai, maupun protein hidrolisat (Ward, 1983 dalam Thamrin, 2001).

Beberapa enzim protease komersial yang banyak dikenal adalah papain dari pepaya dan bromelin dari nenas. Mikroba sebagai sumber

enzim protease telah banyak dieksplorasi, termasuk mikroba-mikroba dari laut. Beberapa mikroorganisme penghasil protease adalah bakteri *Bacillus megaterium* yang diisolasi dari lapisan kulit teripang dan *Micrococcus luteus* yang diisolasi dari isi perut cumi-cumi. (Perangin-angin *et al.*, 1997). Disebutkan bahwa telaa protease netral termostabil telah banyak dilaporkan, antara lain: *Bacillus stearothermophilus* MK232 aktif pada suhu 70°C (Kubo *et al.*, 1988 dalam Thamrin, 2001).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Air Laut Panas

Air laut panas diambil dari perairan Laut Poso, Sulawesi Tengah dengan suhu perairan 55°C. Sebanyak 10 liter air laut disaring dengan menggunakan kertas saring yang berukuran 0,45 mm, selanjutnya filtrat yang diperoleh disaring ulang dengan menggunakan kertas saring Whatman 0,22 mm untuk mengumpulkan sel-sel bakteri. Sel bakteri yang diperoleh dimasukkan ke dalam larutan bufer kemudian dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta dan disimpan pada suhu -20°C, selanjutnya dilakukan analisis.

Media Isolasi Bakteri

Media untuk menumbuhkan bakteri terdiri atas media padat dibuat dengan komposisi kalium dihydrogenphosphat 0,008%; ammonium sulfat 0,04%; magnesium sulfat 0,01%; natrium chlorid 0,1%; *bacteriological pepton* 0,5%; *bacto yeast extract* 0,1%; *bacto agar* 2%; ditambah akuades dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri steril, dan didiamkan sampai beku (Fawzya, 2004).

Media Bakteri Penghasil Protease

Media yang digunakan untuk skrining bakteri penghasil protease adalah media padat dengan komposisi sama dengan media untuk isolasi, tetapi ditambah *skim milk* 2%. Sterilisasi media dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit kecuali *skim milk* yaitu pada suhu 100°C selama 10 menit. Media yang sudah steril dicampur dan dituang ke dalam cawan petri steril, dan didiamkan sampai beku (Fawzya, 2004).

Lain-lain

Alat-alat yang digunakan meliputi gelas ukur, nampan plastik, keranjang plastik, *beaker glass*, *spatula*, *erlenmeyer*, timbangan analitik, *autoclave*, *vortex*, *mikro pipet*, tip ukuran 0,1 mL, pembakar *bunsen*, inkubator bersuhu 55°C, oven, lemari pendingin, jarum ose, botol kaca, *spreader*, *laminar*, *coloni counter*, jangka sorong/penggaris, dan mikroskop. Sedangkan bahan pelengkap lain yang dipakai adalah plastik tahan panas, alkohol 70%, spirtus, *parafilm*, kapas, kertas label, kertas tisu, kertas pembungkus cawan petri, karet gelang, dan spidol permanen.

Metode Isolasi

Isolasi dimulai dengan menghomogenkan contoh air dengan menggunakan *vortex*. Sebanyak 0,1 mL air laut panas diinokulasi ke dalam media padat kemudian contoh diratakan atau disebar pada permukaan media hingga merata dengan menggunakan *spreader*, inkubasi pada suhu 55°C selama 48 jam. Pengamatan morfologi dilakukan terhadap bakteri yang tumbuh. Morfologi koloni bakteri yang diamati meliputi bentuk fisik, tepian, elevasi, bau, warna, dan diameter koloni (Hadioetomo, 1990). Koloni-koloni tersebut ditanam kembali untuk mendapatkan kultur turunan (*sub cultur*). Kultur turunan yang diperoleh digoreskan secara kuadran pada media padat yang sama dan diinkubasi dengan cara yang sama. Pengamatan dilakukan terhadap koloni tunggal yang tumbuh setelah dimurnikan terlebih dahulu dengan cara yang sama. Koloni yang tumbuh secara terpisah dianggap sebagai koloni tunggal karena berasal dari sel tunggal murni (*original culture*) yang selanjutnya ditanam kembali (Gambar 1) ke dalam media padat yang mengandung *skim milk*, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C. Penanaman dilakukan berulang-ulang sampai

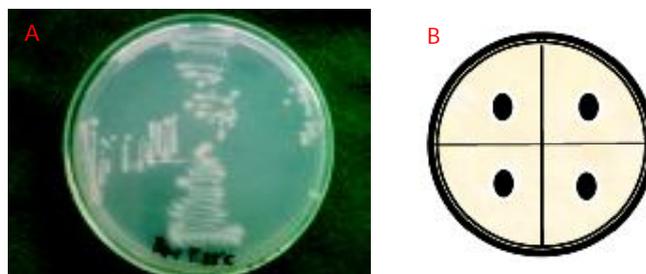
diperoleh koloni yang tetap dan membentuk zona bening. Terbentuknya zona bening di sekeliling koloni menunjukkan terjadi hidrolisis protein oleh bakteri yang berarti isolat mampu menghasilkan protease. Perbandingan diameter zona bening di sekeliling koloni dengan diameter koloni merupakan Indeks Proteolitik (IP). Terhadap koloni-koloni tersebut dan dilakukan pengamatan lebih lanjut melalui pewarnaan Gram (Lay, 1994).

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi bakteri dari contoh air laut panas asal perairan Laut Poso, Sulawesi Tengah, menghasilkan 10 isolat bakteri dari 7 contoh yang diuji. Hasil pengamatan morfologi terhadap bakteri yang tumbuh dapat dilihat pada Tabel 1.

Skrining bakteri termofilik penghasil protease dapat dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri dalam media padat yang mengandung *skim milk* kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam hingga 48 jam. Koloni yang tumbuh di atas media selektif dan membentuk zona bening di sekitar koloni merupakan koloni bakteri termofilik penghasil protease (Gambar 2). Zona bening menunjukkan bahwa bakteri termofilik mempunyai kemampuan memproduksi enzim protease dengan cara menghidrolisis substrat *skim milk* yang tersedia di dalam media padat.

Hasil skrining pada suhu 55°C menunjukkan bahwa dari 7 (tujuh) contoh mata air laut panas asal perairan Laut Poso Sulawesi Tengah diperoleh 10 (sepuluh) isolat yang mempunyai sifat termofilik dan mampu memproduksi protease. Isolat-isolat tersebut memiliki kode P1-3, P1-5, P3-3, P3-5a, P3-5b, P4-1, P4-2, P5-2, P7-2, dan P7-5. Indeks Proteolitik (IP) dihitung dengan cara mengukur perbandingan diameter daerah/zona bening di sekitar koloni dengan diameter koloni,



Gambar 1. Teknik gores (a) dan totol (b) pada media padat

Tabel 1. Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri termofilik asal mata air laut panas, perairan Laut Poso, Sulawesi Tengah

Kode contoh	Kode isolat	Ciri-ciri koloni						
		Bentuk	Tepian	Elevasi	Konsistensi	Warna	Bau	Diameter (cm)
P1	P1-3	tidak beraturan	berombak	timbul	berlendir, berkilau	krem	bau	0,5
	P1-5	tidak beraturan	berbelah	timbul	berlendir	krem keruh	bau	1,0
P2	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	P3-3	tidak beraturan	berbelah	timbul	lembut	krem	bau	1,3
	P3-5a	tidak beraturan	berbelah	cembung di tengah	berlendir	krem	bau	1,2
	P3-5b	tidak beraturan	berbelah	timbul	berlendir	krem	bau	1,3
P4	P4-1	tidak beraturan	berbelah	timbul	berlendir, lengket	krem	bau	1,1
	P4-2	tidak beraturan	berombak	berbintil-bintil	tidak berlendir	krem redup	bau	1,2
P5	P5-2	tidak beraturan	berbelah	timbul	lembut	putih redup	bau	1,2
P6	-	-	-	-	-	-	-	-
P7	P7-2	tidak beraturan	bergerigi	Datar	tidak berlendir	pink	bau	0,3
	P7-5	tidak beraturan	berbelah	timbul	lembut	krem	bau	1,1



Gambar 2. Bakteri termofilik penghasil protease

dengan lama inkubasi 24 jam dan 48 jam (Tabel 2). Isolat-isolat bakteri termofilik penghasil protease tersebut memiliki Indeks Proteolitik (IP) yang berbeda-beda. Hal ini diduga disebabkan karena lama waktu inkubasi

berpengaruh terhadap produksi enzim proteolitik. Dari hasil pengamatan dapat dilihat bahwa isolat dengan kode P3-5a mempunyai Indeks Proteolitik tertinggi.

Berdasarkan pewarnaan Gram, seluruh isolat termofilik termasuk kedalam kelompok bakteri Gram negatif., bentuk sel batang berpasangan (*diplobacillus*) tidak berspora.

KESIMPULAN

Skining bakteri termofilik penghasil protease asal mata air laut panas di perairan Laut Poso, Sulawesi Tengah, menghasilkan lima isolat bakteri proteolitik yaitu bakteri penghasil protease, dengan kode isolat P1-3, P1-5, P3-3, P3-5a, P3-5b, P4-1, P4-2, P5-2, P7-2, dan P7-5. Isolat dengan kode P3-5a memiliki Indeks Proteolitik (IP) tertinggi. Zona bening yang dihasilkan di sekeliling koloni yang tumbuh

Tabel 2. Indeks proteolitik (IP) bakteri termofilik asal mata air laut panas, perairan Laut Poso, Sulawesi Tengah

Nama isolat	Diameter zona bening (cm)		Diameter koloni (cm)		Indek proteolitik (IP)	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
P1-3	2,2	4,0	1,7	3,1	1,29	1,29
P1-5	2,1	2,3	1,3	1,4	1,61	1,63
P3-3	2,9	4,7	1,7	2,7	1,70	1,74
P3-5a	3,55	4,71	1,3	1,7	2,73	2,77
P3-5b	1,7	2,7	1,3	1,9	1,30	1,42
P4-1	1,1	1,7	0,9	1,3	1,22	1,30
P4-2	5,5	8,0	5,0	7,2	1,10	1,11
P5-2	3,8	7,7	3,6	7,3	1,05	1,05
P7-2	1,4	2,2	0,65	0,9	2,33	2,44
P7-5	6,7	7,7	6,5	7,3	1,03	1,05

pada media selektif yaitu media yang mengandung *skim milk* menunjukkan bahwa bakteri termofilik tersebut mampu menghasilkan enzim protease.

UCAPAN TERIMA KASIH

- ◆ Ucapan terima kasih ditujukan kepada Ibu Ir. Yusro Nuri Fawzya, M.Si. yang telah menyediakan waktunya dan memberikan pengarahan serta bimbingannya.
- ◆ Kepada kelompok peneliti Lab. Bioteknologi BBRP2B, Jakarta dan rekan-rekan teknis atas dukungan dan motivasinya.

DAFTAR PUSTAKA

Fawzya, Y.N., N. Indriati, dan T.D. Suryaningrum. 2004. Pengaruh Penambahan Kitin pada Medium Produksi terhadap Aktivitas Kitin Deasetilase dari *Bacillus* K29-14. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Edisi Pasca Panen. Badan Riset Kelautan dan Perikanan Departemen Kelautan dan Perikanan, 10(3): 11—17.

Hadieotomo, R.S. 1990. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Penerbit PT Gramedia, Jakarta, 163 pp.

Hartono, N. 1995. *Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Penghasil Protease dari Ikan*. p. 1—4.

Lay, B.W. *Analisis Mikroba di Laboratorium Manajemen P. Raja Grafindo Persada*, p. 13—22.

Perangin-angin, R., S. Amini, N. Retnowati, N. Dolaria, dan Sabaruddin. 1997. *Penelitian Mikroba Imobil sebagai Sumber Biokatalis Penelitian Teknik Mikroba Imobil Penghasil Protease dari Hasil Limbah Industri Perikanan*. Laporan Teknik Penelitian. Tahun Anggaran 1997/1998 Bagian Proyek Penelitian dan Pengembangan Perikanan Sliipi. Balai Penelitian Perikanan Laut. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 6 pp.

Suriawiria, U. 1996. *Mikrobiologi Air dan Dasar-dasar Pengolahan Buangan Secara Biologis*, 322 pp.

Thamrin, E. 2001. *Kloning Gen Penyandi Hidrolase dari Sumber Air Panas Rimbo Panti, Sumatera Barat Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor*, 63 pp.