

Eksplorasi Bakteri Penghasil Enzim Protease pada Air Rawa Tanjung Senai Indralaya Sumatera Selatan

Exploration of Protease Enzyme Producing Bacteria from Water in Tanjung Senai Swamp Indralaya South Sumatra

Ace Baehaki^{1*)}, Rodiana Nopianti¹, Erwin Saputra¹, Nuni Gofar²

¹Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Indralaya Sumatera Selatan 30862

²Program Studi Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya

^{*)}Penulis untuk korespondensi: acebaehaki_thi@unsri.ac.id

Sitasi: Baehaki A, Nopianti R, Saputra E, Gofar N. 2019. Exploration of protease enzyme producing bacteria from water in tanjung senai swamp Indralaya South Sumatra. In: Herlinda S *et al.* (Eds.), Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal 2019, Palembang 4-5 September 2019. pp. 121-131. Palembang: Unsri Press.

ABSTRACT

Protease is a complex enzyme that plays a role in its application in the physiological field and commercial products. The aims of this research were to protease enzyme producing bacteria, to know the protease enzyme activity of bacteria isolate from water swamp and identify protease enzyme producing bacteria. This research was conducted by using laboratory experimental method and the data was analyzed descriptively. The result of this research indicates that the Tanjung Senai AR₁TS₁ show the activity of protease enzyme and produce the highest proteolytic index among the other samples. Based on Gram staining test, morphology of bacterial cell, motility test, catalase test, sugar fermentation test and H₂S, oxygen needed test that kind of bacteria for AR₁TS₁ isolate was *Listeria*.

Keywords: bacteria, proteolytic, swamp, water

ABSTRAK

Protease merupakan enzim yang kompleks yang berperan dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersial. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim protease, mengetahui aktivitas enzim protease isolat bakteri dari air rawa dan mengidentifikasi bakteri penghasil enzim protease. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan laboratorium dan analisis data dilakukan secara deskriptif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat air rawa Tanjung Senai AR₁TS₁ menunjukkan adanya aktivitas enzim protease dan menghasilkan indeks proteolitik yang tertinggi dibandingkan dengan sampel lainnya. Berdasarkan uji pewarnaan Gram, morfologi sel bakteri, uji motilitas, uji katalase, uji fermentasi gula dan H₂S, uji kebutuhan oksigen menunjukkan isolat AR₁TS₁ diduga termasuk ke dalam bakteri *Listeria*.

Kata kunci: air, bakteri, proteolitik, rawa

PENDAHULUAN

Mikroorganisme dan enzim banyak dimanfaatkan industri untuk menghasilkan produk yang bernilai tinggi dalam skala industri. Enzim protease digunakan dalam industri pangan seperti industri keju, bir, roti dan daging, sedangkan di bidang non pangan enzim ini dimanfaatkan di industri detergen, farmasi, fotografi, tekstil dan kulit (Suhartono, 1989).

Menurut Lehninger (1995) bahwa enzim-enzim banyak digunakan pada industri dikarenakan mempunyai daya katalitik yang lebih besar dari katalisator sintetik, tidak beracun, alami dapat digunakan untuk memperbaiki produk seperti mengubah warna, aroma, tekstur, dan rasa. Protease merupakan satu diantara tiga kelompok enzim komersial yang diperdagangkan dengan nilai mencapai 60% total penjualan enzim yang aplikasinya sebagai katalisator hayati, digunakan di dalam industri pangan, detergen dan kulit (Suhartono, 2000).

Protease merupakan enzim yang mampu mengkatalisis pemecahan ikatan peptide di dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi ikatan yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino (Naiola dan Widyastuti, 2002). Protease merupakan enzim yang kompleks yang berperan dalam aplikasinya pada bidang fisiologis dan produk-produk komersial. Protease ekstraseluler berperan dalam menghidrolisis substrat polipeptida besar. Enzim proteolitik berperan penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel tumbuhan, sel hewan dan mikroorganisme, seperti mengganti protein, menjaga kesetimbangan antara mendegradasi dan mensintesis protein (Rao *et al.*, 1989).

Di daerah Indralaya memiliki banyak sekali rawa-rawa yang belum dimanfaatkan secara optimal, yang mana rawa-rawa di daerah ini kebanyakan digunakan oleh masyarakat untuk membuang sisa-sisa makanan dan terkadang hanya ditimbun kembali untuk didirikan bangunan. Baehaki *et al.* (2011) telah mengisolasi dan mengkarakterisasi protease dari tanah rawa Indralaya, Ramiadi (2008) telah mengisolasi dan mengkarakterisasi protease ekstrak kasar dari bakteri air rawa Sakatiga Kabupaten Ogan Ilir. Potensi inilah yang ingin dimanfaatkan untuk memperoleh enzim yang bersumber dari rawa-rawa yang ada di daerah Indralaya Kabupaten Ogan Ilir Sumatera Selatan ini.

Enzim sangat dibutuhkan oleh berbagai macam industri baik industri produk pertanian, kimia maupun medis, sehingga perlu mencari enzim dari mikroba dengan habitat yang berbeda sehingga diharapkan enzim yang dihasilkan memiliki karakter-karakter yang unik. Salah satu sumber enzim adalah dari perairan rawa, dimana penelitian ini dilakukan di rawa Tanjung Senai, Sumatera Selatan dimana daerah ini memiliki rawa yang luas yang memungkinkan mikroba penghasil enzim dapat ditemukan.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu autoklaf, cawan petri, gelas ukur, inkubator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, erlenmeyer, sentrifugator, botol selai, shaker, neraca analitik, magnetik stierer, penangas air, labu ukur, beaker glass, bunsen, jarum ose, pipet mikro, spektrofotometer, kaca preparat, tabung effendorf, mikroskop, pipet tetes, laminar flow, tipe, dan vortex.

Bahan yang digunakan yaitu air rawa, sedimen rawa, isolat bakteri, aquadest, spiritus, nutrien agar (NA), Skim Milk Agar (SMA), Buffer Tris-HCl, Kasein 2%, Tirosin Standar, Pereaksi Folin, Filtrat enzim, Tripton 1%, NaCl, yeast extract 0,5 %, comassie brilliant blue, Bovine Serum Albumin (BSA), ethanol 96%, asam ostofosfat, asam trichloroasetat (TCA), Na₂CO₃, nutrient broth (NB), agar bakteriologis, kristal violet, safranin, alkohol, Sulfid Indol Motility (SIM), Triple Sugar Iron Agar (TSIA).

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode laboratorium eksperimental. Pada penelitian ini sampel air rawa dan sedimen rawa diambil dari rawa Tanjung Senai dan rawa Sakatiga Kabupaten Ogan Ilir Sumatera Selatan, kode AR (Air Rawa) dan kode SR

(Sedimen Rawa), dan ada beberapa tahapan yang dilakukan, yaitu dari skrining bakteri yang ada pada air dan sedimen rawa yang mana masing-masing di ambil dari rawa Tanjung Senai dan rawa Sakatiga, selanjutnya dilakukan uji aktivitas proteolitik terhadap bakteri hasil isolasi dari air dan sedimen rawa. Aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri, yang selanjutnya diidentifikasi bakteri penghasil proteolitik yang terbaik.

Pengambilan Sampel

Sampel air rawa dan sedimen rawa diambil dari rawa Tanjung Senai masing-masing terdiri dari 3 stasiun yang berjarak 2 meter antara stasiun satu dan stasiun yang lainnya, tempat pertama berada pada tempat yang dekat dengan pemukiman warga dan tempat kedua berada pada tempat yang jauh dari pemukiman warga. Isolat yang memiliki kode sampel AR1TS1 menunjukkan sampel tersebut diambil dari air rawa stasiun 1 rawa Tanjung Senai pada tempat pertama, begitu juga seterusnya pemberian kode sampel sampai pada sampel SR3SK2 yang menunjukkan bahwa sampel tersebut diambil dari sedimen rawa stasiun 3 rawa Sakatiga pada tempat yang kedua.

Isolasi Mikroba Rawa

Isolasi mikroba dilakukan dengan mengambil sampel air dari daerah Tanjung Senai Sumatera Selatan secara aseptik. Sebanyak 1 ml sampel air rawa dan sebanyak 1 gr sampel sedimen rawa masing-masing ditumbuhkan dalam cawan petri dengan media Nutrient Agar (NA) yang sebelumnya dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} untuk mendapatkan biakan bakteri murni, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C.

Uji Proteolitik

Uji proteolitik isolat bakteri berdasarkan Baehaki *et al.* (2011), dilakukan menggunakan media skim milk agar (SMA) yaitu media LBA yang ditambah susu skim 2%. Isolat ditusukkan dalam media SMA, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C selama 56 jam. Aktivitas proteolitik dari bakteri rawa yang ditumbuhkan pada media SMA ditunjukkan dengan terlihatnya areal bening yang muncul di sekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur diameter areal bening dan diameter koloni bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan diameter areal bening dengan diameter koloni bakteri.

Pengukuran Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas protease berdasarkan metode Bergmeyer *et al.*, (1983) menggunakan substrat kasein Hammerstein 2% (b/v). Pengukuran aktivitas protease dapat dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 0,2 ml enzim dengan 1 ml substrat kasein Hammerstein dn 1 ml buffer. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,2 M asam trikoloasetat (TCA). Larutan tersebut diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Na_2CO_3 0,4 M, kemudian ditambah pereaksi folin Ciocalteau (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda=578$ nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi optimum pengukuran.

Menurut Bergmeyer *et al.* (1983) aktivitas protease dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas protease (IU/ml)} = \frac{\text{Asp} - \text{Abl}}{\text{Ast} - \text{Abl}} \times \frac{\text{P}}{\text{T}}$$

Keterangan :

Asp = Nilai Absorbansi Sampel

Ast = Nilai Absorbansi Standar

Abl = Nilai Absorbansi blanko

P = Faktor Pengenceran

T = Waktu Inkubasi

Uji Morfologi Koloni

Uji morfologi dilakukan untuk dapat mengetahui sifat dan bentuk morfologi bakteri penghasil protease, pengamatan dilakukan dengan mengamati morfologi koloni dan sel bakteri. Uji morfologi koloni untuk mengetahui warna koloni, bentuk dari samping, penonjolan dan bentuk koloni dari atas (secara visual). Sedangkan uji morfologi sel meliputi pengamatan bentuk sel, pewarnaan gram dan uji motilitas.

Pengamatan Bentuk Sel

Berdasarkan hasil preparat bakteri yang telah dibuat diamati bentuknya secara mikroskopik untuk mengetahui bentuk bakteri spiral, kokus atau batang (Yulvizar, 2013).

Pewarnaan Gram (Fitri dan Yasmin, 2011)

Teteskan aquadest pada kaca objek kemudian ditambahkan dengan 1 ose biakan sampel, lalu difiksasi di atas api. Tetesi pewarnaan kristal violet dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, kemudian ditetesi dengan lugol biarkan selama satu menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya tetesi alkohol 96% biarkan selama 10-20 detik, cuci dengan air mengalir dan tambahkan safranin biarkan selama 20-30 detik kemudian cuci lagi dengan air mengalir. Tahap selanjutnya keringkan dengan menggunakan kertas serap dan tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah gram positif.

Uji Motilitas (Sudarsono, 2008 dalam Yulvizar 2013)

Cara kerja yang dilakukan untuk uji motilitas, isolat bakteri ditusukkan kedalam media SIM semi padat pada tabung reaksi menggunakan jarum ose steril kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C. Uji positif ditandai dengan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut bergerak (motil) dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak (non motil)

Uji Katalase (Rahmi *et al.*, 2015)

Bakteri diambil satu ose dari agar miring dan dipindahkan pada gelas obyek yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian teteskan 1-3 tetes larutan H₂O₂ 3%. Adanya enzim katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung kecil oksigen yang terlihat seperti busa sabun, enzim katalase berperan dalam memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji katalase yang berifat positif ditandai dengan adanya gelembung-gelembung pada bakteri setelah ditetesi dengan larutan H₂O₂, serta uji katalase yang bersifat negatif ditandai dengan tidak terdapatnya gelembung-gelembung oksigen pada bakteri.

Uji Fermentasi Gula dan H₂S (Fardiaz, 1987)

Uji fermentasi gula menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), isolat yang akan diuji diinokulasi pada agar miring TSIA dengan cara membuat goresan pada agar miring dan menusukkannya pada bagian bawah agar kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk memfermentasi gula-gula tertentu dengan menghasilkan asam, basa atau gas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Mikroba Rawa

Isolasi mikroba rawa dilakukan terhadap bakteri yang terdapat pada air rawa Tanjung Senai Indralaya, sampel air rawa dan sedimen rawa ini diambil dari dua tempat pada rawa yang sama yang masing-masing terdiri dari tiga stasiun.

Tabel 1. Jumlah koloni bakteri pada media

Rawa	Kode Sampel	Pengenceran	Koloni Bakteri
Tanjung Senai	AR ₁ TS ₁	10 ⁻⁵	1AR ₁ TS ₁ , 2AR ₁ TS ₁ , 3AR ₁ TS ₁
	AR ₂ TS ₁		1AR ₂ TS ₁ , 2AR ₂ TS ₁ , 3AR ₂ TS ₁ , 4AR ₂ TS ₁ , 5AR ₂ TS ₁
	AR ₃ TS ₁		1AR ₃ TS ₁ , 2AR ₃ TS ₁ , 3AR ₃ TS ₁ , 4AR ₃ TS ₁ , 5AR ₃ TS ₁
	AR ₁ TS ₂		1AR ₁ TS ₂ , 2AR ₁ TS ₂ , 3AR ₁ TS ₂ , 4AR ₁ TS ₂ , 5AR ₁ TS ₂ , 6AR ₁ TS ₂ , 7AR ₁ TS ₂ , 8AR ₁ TS ₂ , 9AR ₁ TS ₂ , 10AR ₁ TS ₂ , 11AR ₁ TS ₂
	AR ₂ TS ₂		1AR ₂ TS ₂ , 2AR ₂ TS ₂ , 3AR ₂ TS ₂ , 4AR ₂ TS ₂ , 5AR ₂ TS ₂ , 6AR ₂ TS ₂ , 7AR ₂ TS ₂ , 8AR ₂ TS ₂ , 9AR ₂ TS ₂ , 10AR ₂ TS ₂ , 11AR ₂ TS ₂ , 12AR ₂ TS ₂ , 13AR ₂ TS ₂ , 4AR ₂ TS ₂
	AR ₃ TS ₂		1AR ₃ TS ₂ , 2AR ₃ TS ₂ , 3AR ₃ TS ₂

Kode yang digunakan dalam pengambilan sampel ini yaitu kode AR (Air Rawa) pada tempat yang diberi kode TS (Tanjung Senai), setiap tempat dan stasiun diberikan kode yang berbeda-beda seperti sampel dengan kode AR1TS1 menunjukkan bahwa sampel ini diambil dari air rawa stasiun 1 rawa Tanjung Senai pada tempat pertama, AR2TS1 menunjukkan bahwa sampel ini diambil dari air rawa stasiun 2 rawa Tanjung Senai pada tempat pertama, sampel dengan kode AR1TS2 menunjukkan bahwa sampel ini diambil dari air rawa stasiun 1 rawa Tanjung Senai pada tempat yang kedua, begitupun seterusnya. Sampel yang telah diambil dari rawa kemudian dibawa ke laboratorium untuk kemudian dilakukan pengenceran dari 10⁻¹ sampai 10⁻⁵, dari pengenceran 10⁻⁵ ini kemudian masing-masing sampel ditumbuhkan ke dalam media *Nutrient Agar* (NA) di dalam cawan petri dengan menggunakan metode gores lalu diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37 °C dalam keadaan terbalik selama 24 jam. Setelah di inkubasi selama 24 jam media NA tersebut akan ditumbuhi oleh bakteri-bakteri yang telah ditumbuhkan pada NA tersebut.

Setelah sampel diambil dari air rawa kemudian sampel ditumbuhkan ke dalam cawan petri yang telah diisi dengan media *Nutrient Agar* (NA) kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh di dalam cawan petri tersebut. Dari uji yang telah dilakukan sebelumnya didapatkan jumlah keseluruhan isolat yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* (NA) ini terdiri dari 40 isolat dari 3 stasiun. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media NA dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari hasil isolasi bakteri dari setiap stasiun air rawa dan sedimen rawa tersebut diambil satu isolat tunggal yang dipilih secara acak dari masing-masing stasiun air dan sedimen rawa tersebut untuk kemudian dilakukan uji proteolitik dengan cara ditumbuhkan pada media skim milk agar (SMA).

Uji Proteolitik

Uji proteolitik dilakukan dengan cara memindahkan isolat bakteri yang telah di isolasi ke dalam media Skim Milk Agar (SMA), uji proteolitik ini lakukan dengan tujuan untuk mengetahui bakteri yang berpotensi sebagai penghasil protease atau tidak, dimana aktivitas proteolitik ini ditandai dengan terlihat zona bening yang ada di sekitar bakteri. Baehaki *et al.* (2012) menyatakan, aktivitas proteolitik dari bakteri rawa yang ditumbuhkan pada medium SMA ditunjukkan dengan terlihatnya areal bening yang muncul di sekitar koloni yang terbentuk.

Bakteri yang menghasilkan enzim protease ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni pada media skim milk agar yang menandakan bahwa bakteri tersebut merombak protein, besarnya aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona bening yang dihasilkan. Menurut Naiola dan Widhyastuti (2002) hasil perombakan polimer protein ditunjukkan dengan adanya zona bening yang menandakan bahwa protein telah berhasil dirombak menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya larut dalam media. Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya diameter zona bening disekitar koloni dengan besarnya diameter koloni bakteri.

Setelah didapatkan zona bening dari isolat bakteri air rawa Tanjung Senai, selanjutnya dihitung indeks proteolitik dari masing-masing isolat tersebut dengan cara menghitung membandingkan antara diameter zona bening yang terdapat disekitar koloni bakteri dengan diameter koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media skim milk agar, pernyataan ini juga didasarkan atas pernyataan Baehaki *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur diameter zona bening dan diameter koloni bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan diameter areal bening yang berada disekitar koloni dengan diameter koloni bakteri. Indeks proteolitik dari isolat bakteri air rawa dan sedimen rawa dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Indeks uji proteolitik bakteri tumbuhan rawa

Isolat Bakteri	Indeks Proteolitik
AR ₁ TS ₁	1,31
AR ₂ TS ₁	1,28
AR ₃ TS ₁	1,30
AR ₁ TS ₂	1,30
AR ₂ TS ₂	1,08

Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa tidak semua bakteri dapat merombak protein yang terdapat di dalam media skim milk agar hal ini didukung oleh pernyataan Yuanita dan Wikandari (2014) yang menyatakan bahwa isolat yang tidak mengindikasikan sifat proteolitik dengan ditandai tidak adanya zona bening disekitar koloni mungkin disebabkan oleh ketidakcocokan antara substrat kasein yang ada pada media skim milk agar dengan protease yang dihasilkan oleh isolat tersebut atau isolat tersebut tidak menghasilkan enzim protease.

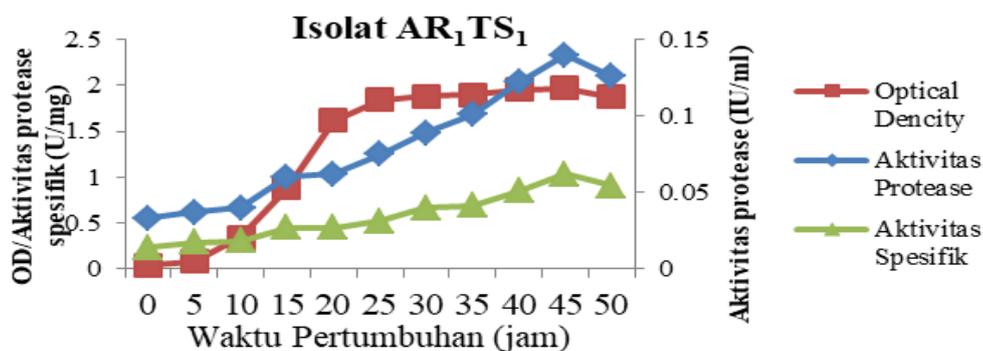
Hasil pengukuran indeks proteolitik tersebut menunjukkan bahwa 5 isolat bakteri memiliki indeks proteolitik yang berkisar antara 1,08-1,31, indeks proteolitik tertinggi pada air rawa Tanjung Senai terdapat pada isolat AR₁TS₁ yaitu sebesar 1,31. Isolat dari hasil uji proteolitik bakteri air rawa dan sedimen rawa yang memiliki indeks proteolitik yang tertinggi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Zona bening dari isolat bakteri rawa yang memiliki aktivitas proteolitik yang tertinggi (isolat bakteri air rawa Tanjung Senai (AR₁TS₁))

Aktivitas Protease

Penentuan aktivitas protease ini dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri air rawa dan sedimen rawa tersebut ke dalam media LB, pengamatan ini dilakukan selama 50 jam dengan menggunakan *shaker* dimana sampel diambil setiap 5 jam sekali di mulai dari pengambilan sampel 0 jam sampai pengambilan sampel ke 50 jam, kemudian diukur nilai OD (*Optical Density*) dengan panjang gelombang 620 nm. Sampel yang telah diambil setiap 5 jam tersebut kemudian di ekstrak dengan cara di sentrifugus dengan menggunakan alat sentrifuge dingin yang bersuhu sekitar 4 °C dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit kemudian pisahkan antara endapan dengan supernatan. Hasil dari pengukuran aktivitas protease serta pengukuran kadar protein pada isolat Air Rawa Tanjung Senai (AR₁TS₁) dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2. Aktivitas protease dan kadar protein isolate bakteri AR₁TS₁

Aktivitas optimum produksi protease pada isolat bakteri AR₁TS₁ ini terjadi pada jam ke-45 yaitu sebesar 0,1409 U/ml dan waktu optimum aktivitas spesifik isolat AR₁TS₁ ini terjadi pada jam ke-45 juga dengan kadar protein sebesar 0,0627 U/mg, dimana hasil pengukuran aktivitas protease spesifik ini diperoleh dari hasil perbandingan antara aktivitas protease dengan kadar protein.

Penelitian Ramiadi (2008) melaporkan bahwa isolat bakteri dari air rawa yang berkode A₄S₃ memiliki aktivitas protease tertinggi pada jam ke-48 sebesar 0,517 IU/ml dengan nilai OD (*Optical Density*) sebesar 1,379 pada jam ke-48, isolat bakteri A₆S₃ memiliki aktivitas tertinggi sebesar 0,521 IU/ml pada jam ke-48 dengan nilai OD tertinggi

sebesar 1,304 pada jam ke-48 dan isolat A₁₅S₃ yang memiliki aktivitas tertinggi pada jam yang sama yaitu pada jam ke-48 sebesar 0,528 IU/ml dengan nilai OD sebesar 1,605 pada jam ke-48.

Morfologi Koloni Bakteri

Pada uji morfologi koloni ini pengamatan dilakukan secara langsung, kemudian diamati bentuk-bentuk koloni bakteri mulai dilihat dari atas, dilihat dari samping, penonjolan koloni, serta warna koloni bakteri tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan koloni bakteri tersebut isolat bakteri AR₁TS₁ memiliki bentuk bulat pada pengamatan dari atas, untuk pengamatan dari samping isolat bakteri AR₁TS₁ memiliki bentuk yang halus, berdasarkan penonjolannya hanya isolat AR₁TS₁ yang memiliki bentuk yang datar berdasarkan dari warnanya, isolat AR₁TS₁ berwarna putih.

Morfologi Sel

Pada uji morfologi sel, isolat-isolat yang terdiri dari isolat AR₁TS₁ dilakukan uji pewarnaan gram dimana uji pewarnaan gram dilakukan dengan menggunakan mikroskop untuk melihat bentuk-bentuk bakteri dari isolat-isolat tersebut, pada uji pewarnaan Gram setiap isolat bakteri yang diamati berbentuk batang serta semua isolat tersebut termasuk ke dalam kelompok gram positif dimana kelompok bakteri gram positif ini ditandai dengan bakteri yang berwarna ungu sedangkan apabila bakteri tersebut berwarna merah menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk ke dalam kelompok bakteri gram negatif. Hasil pewarnaan gram dari isolat AR₁TS₁ dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pewarnaan Gram bakteri penghasil protease

Isolat	Kelompok Gram	Bentuk
AR ₁ TS ₁	Positif	Batang

Menurut Pratiwi (2008) bahwa bentuk-bentuk bakteri itu terdiri dari bakteri yang berbentuk bulat, batang atau silinder, dan spiral yaitu bakteri yang berbentuk batang melengkung atau melingkar-lingkar. Berdasarkan pernyataan Lay (1994) bahwa pewarnaan gram adalah proses pewarnaan yang dilakukan untuk mengelompokkan bakteri antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri yang mampu mempertahankan zat warna kristal violet akan terlihat berwarna ungu tua maka bakteri ini disebut bakteri gram positif, sedangkan bakteri gram negatif akan kehilangan zat warna kristal violet setelah dicuci dengan menggunakan alkohol, dan ketika diberi zat warna safranin akan tampak berwarna merah. Perbedaan dari zat warna ini disebabkan oleh adanya perbedaan dalam struktur kimiawi dinding selnya. Menurut Fardiaz (1989) bahwa prinsip dari pewarnaan gram adalah kemampuan bakteri untuk mengikat zat warna dasar setelah dilakukan pencucian dengan alkohol, pada bakteri gram positif mengandung peptidoglikan lebih banyak dan lemak lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri gram negatif.

Uji Motilitas

Pada uji motilitas terhadap isolat AR₁TS₁ ini semuanya bersifat motil, dimana pada daerah bekas tusukan pada media agar tegak yang telah diinokulasi dan diinkubasikan selama 24 jam ini menunjukkan adanya pergerakan bakteri berupa penyebaran bakteri pada media. Hasil uji motilitas bakteri dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji motilitas bakteri

Isolat	Uji Motilitas
AR ₁ TS ₁	Motil

Hasil positif (motil) apabila terdapat rambatan-rambatan di sekitar bekas tusukan jarum pada medium dan hasil negatif (non motil) bila tidak terdapat rambatan-rambatan disekitaran bekas tusukan jarum ose pada medium (Sardiani *et al.*, 2015). Flagella salah satu struktur utama diluar sel bakteri yang menyebabkan terjadinya pergerakan (motilitas) pada sel bakteri (Pelczar *et al.*, 1988).

Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil sebanyak satu ose bakteri dari media agar kemudian dipindahkan pada kaca preparat kemudian diteteskan larutan H₂O₂ 3% sebanyak 1-3 tetes. Pada uji katalase ini isolat AR₁TS₁ menunjukkan hasil yang positif dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara, seperti pernyataan Djide dan Wahyudin (2008) yang menyatakan bahwa reaksi katalase yang menunjukkan hasil positif apabila terbentuknya gelembung-gelembung udara yang menunjukkan terbentuknya gas O₂ dan apabila tidak terbentuk gelembung-gelembung udara maka uji katalase tersebut menunjukkan hasil yang negatif. Hasil dari uji katalase isolat bakteri AR₁TS₁ dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji katalase isolat bakteri

Isolat	Uji Katalase
AR ₁ TS ₁	Positif

Menurut Hadioetomo (1993) menyatakan bahwa uji katalase dilakukan untuk mengetahui aktivitas katalase pada isolat-isolat bakteri, umumnya bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂, bakteri katalase negatif tidak menghasilkan gelembung-gelembung, hal ini menunjukkan bahwa bakteri katalase negatif tidak dapat memecah atau menguraikan H₂O₂. Mekanisme kerja enzim katalase memecah H₂O₂ adalah ketika melakukan respirasi bakteri menghasilkan berbagai macam komponen dan salah satunya yaitu H₂O₂, bakteri yang mampu mengurai atau memecah H₂O₂ akan segera membentuk sistem pertahanan dari toksik H₂O₂ yang dihasilkannya sendiri. Bakteri katalase positif mampu memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ yang ditandai dengan adanya gelembung-gelembung.

Uji Fermentasi Gula dan H₂S

Uji fermentasi gula dan H₂S ini dilakukan dengan cara membuat agar miring dengan menggunakan media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu goreskan setiap isolat bakteri tersebut ke dalam media yang telah dibuat, kemudian di inkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Hasil dari uji fermentasi gula dan H₂S ini dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Uji Fermentasi Gula dan H₂S bakteri penghasil protease

Isolat	Warna		Keterangan
	Bagian atas	Bagian bawah	
AR ₁ TS ₁	Merah	Kuning	Fermentasi glukosa

Pada uji fermentasi gula dan H₂S ini didapatkan hasil bahwa isolat AR₁TS₁ yang di uji mampu memfermentasi glukosa yang ditandai dengan agar yang berwarna merah pada bagian permukaan tabung reaksi dan agar yang terletak pada bagian bawah tabung reaksi menghasilkan warna kuning. Sejalan dengan pernyataan Fardiaz (1989) yang menyatakan bahwa warna merah yang terbentuk pada bagian permukaan tabung dan warna kuning yang terbentuk pada bagian bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa namun tidak menghasilkan laktosa dan sukrosa, warna kuning yang terbentuk pada bagian

permukaan dan bawah tabung menunjukkan terjadinya fermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa.

Pendugaan Jenis Bakteri Penghasil Enzim Protease

Untuk menduga jenis bakteri yang didapatkan, setiap isolat bakteri yang menghasilkan enzim protease telah dilakukan uji morfologi koloni secara visual, pewarnaan gram, uji motilitas, uji biokimia bakteri yang meliputi uji katalase, serta uji fermentasi gula dan H₂S. Identifikasi bakteri yang dilakukan ini masih bersifat dugaan, karena untuk mengetahui atau mengidentifikasi bakteri ini secara pasti masih diperlukan beberapa uji lagi yang tidak dilakukan dalam penelitian ini. Pendugaan jenis bakteri ini dilakukan berdasarkan *Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria* (Cowan and Steel, 1974).

Berdasarkan tabel identifikasi gram positif Cowan and Steel (1974), isolat AR₁TS₁ dimana isolat ini merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang, bersifat motil, pada uji katalase kedua isolat ini bersifat positif, serta mampu memfermentasi glukosa. Uji-uji yang telah dilakukan tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri AR₁TS₁ mendekati genus *Listeria*. Berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Bergey *et al.*, 1994) genus *Listeria* termasuk bakteri gram positif, bersifat motil, tidak memproduksi gas, mampu memproduksi glukosa, tidak menghidrolisat urea, katalase positif, tidak menghidrolisat gelatin. Identifikasi tersebut masih bersifat dugaan karena banyak uji-uji lainnya yang belum dilakukan dalam penelitian ini.

KESIMPULAN

Indeks proteolitik tertinggi terdapat pada isolat AR₁TS₁ yang memiliki indeks proteolitik sebesar 1,31. Aktivitas optimum isolat AR₁TS₁ terdapat pada jam ke-45 produksi protease sebesar 0,1409 U/ml dan aktivitas spesifik sebesar 0,0627 U/mg, Berdasarkan tabel gram positif Cowan and Steel's (1974) kedua isolat ini mendekati bakteri yang bergenus *Listeria*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Sriwijaya yang telah mendanai riset ini melalui skema penelitian Hibah Profesi tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki A, Rinto, Budiman A. 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari tanah rawa Indralaya Sumatera Selatan. *J. Teknol. dan Industri Pangan*. 22(1):40-45.
- Bergey DH, Holt JG, Noel RK. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, GraPl M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis Vol 2*. Weinheim: Verlag Chemie.
- Cowan ST, Steel KJ. 1974. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Djide MN, Wahyudin E. 2008. Isolasi bakteri asam laktat dan air susu ibu dan potensinya dalam penurunan kadar kolesterol secara in vitro. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 12 (3): 73-78.
- Fardiaz S. 1987. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Fitri L, Yasmin Y. Isolasi dan pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik. *J. Ilmiah Pendidikan Biologi*. 3(2): 20-25.

- Hadioetomo RS. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta : Rajawali
- Lehninger AL. 1995. *Dasar-dasar Biokimia*. Terjemahan Maggy Thenawidjaya. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Naiola E, Widyastuti N. 2002. Isolasi seleksi dan optimasi produksi protease dari beberapa isolat bakteri. *Hayati*. 6 : 467- 473
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 2*. Terjemahan Ratna Sari, Tedja Imas S, Sutarmi T, Sri Lestari Angka. Jakarta: UI-Press
- Rahmi Y, Darmawi, Mahdi A, Faisal J, Fakhurrazi, Yudha F. 2015. Identification of *Staphylococcus aureus* in preputium and vagina of horses (*Equus caballus*). *J. Medika Veterinaria*. 9(2): 15-158.
- Ramiadi A. 2008. Isolasi dan karakterisasi protease ekstrak kasar dari bakteri air rawa Sakatiga Indralaya Kabupaten Ogan Ilir Sumatera Selatan. [Skripsi]. Indralaya: Universitas Sriwijaya.
- Rao MM, Tanksale AM, Gatge MS, Desphande VV. 1998. Molecular and Biotechnological Aspect Of Microbial Proteases. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 62: 597-635.
- Sardiani N, Litaay M, Budji GR, Priosambodo D, Syahribulan, Dwyana Z. 2015. Potensi tunikata *Rhopalaea sp* sebagai sumber inokulum bakteri *Endosymbion* Penghasil antibakteri: karakterisasi isolat. *Jurnal Alam dan Lingkungan*. 6 (11): 1-10.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Bogor: Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Suhartono MT. 2000. *Pemahaman karakteristik biokimia enzim protease dalam menunjang industri berbasis bioteknologi*. Buku Orasi Ilmiah Guru Besar Ilmu Dasar-Dasar Biokimia Dasar. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Yuanita DN, Wikandari PR. 2014. Screening Bakteri proteolitik termofilik dari sumber air panas Singgahan Tuban. *UNESA J. Chem*. 3(3): 49-54.
- Yulvizar C. 2013. Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik pada *Rastrelliger sp. J. Biospecies*. 6(2): 1-7.