

**AKTIVITAS PROTEASE ALKALIN OLEH BAKTERI TERMOFILIK  
ALKALITOLERAN DARI SUMBER AIR PANAS DESA SUNGAI PINANG  
KABUPATEN KUANTAN SINGINGI, RIAU**

**THE ACTIVITY OF ALKALINE PROTEASE BY BACTERIA THERMOPHILIC  
ALKALITOLERANT FROM SUNGAI PINANG VILLAGE HOT SPRING  
KUANTAN SINGINGI REGENCY, RIAU**

**Tetty Marta Linda <sup>1\*</sup>, Silvera Devi <sup>2</sup>, Rodesia Mustika Roza<sup>1</sup>,  
Maryana <sup>3</sup>, Dorma Uli Silaban<sup>3</sup>**

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam,  
Universitas Riau, Kampus Bina Wydia Km. 12,5 Simpang Baru Pekanbaru 28293<sup>1\*</sup>  
tetty.martalinda@yahoo.com;

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Riau, 28293<sup>2</sup>  
Alumni Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam,  
Universitas Riau, 28293, Pekanbaru<sup>3</sup>

**ABSTRACT**

*Thermophilic bacteria is found at the hot springs sources and has the ability to produce various enzymes. This study showed the activity of thermophilic bacteria isolated from hot spring Sungai Pinang Village Kuantan Singingi Regency, Riau producing alkaline protease. Three isolates of bacteria are identified an ability to produce alkaline protease in Luria Broth medium adding with 1% casein at temperature 50°C and pH8. Isolate SPT(3)7 has the highest alkaline protease activity was 0.254U/ml at 24 hours of incubation. Isolates SPT(2) 4 and SPT(1) 4 has the highest activity 0.230 and 0.127 U/ml at 30 hours incubation time, respectively. Characteristics of bacteria showed three isolates were Gram positive, isolates SPT(3)7 was coccus, isolates SPT(2) 4 and SPT(1) 4 were bacil .*

*Keywords: alkaline protease, thermophilic bacteria, hot spring*

**ABSTRAK**

*Bakteri termofilik banyak dijumpai pada sumber air panas dan memiliki kemampuan menghasilkan berbagai macam enzim. Penelitian ini untuk mengetahui aktivitas bakteri termofilik hasil isolasi dari sumber air panas Desa Sungai Pinang Kabupaten Kuantan Singingi, Riau dalam menghasilkan protease alkalin. Tiga isolat bakteri diketahui memiliki kemampuan menghasilkan protease alkalin pada media luria cair dengan menambahkan kasein 1% pada suhu 50°C dan pH 8. Isolat SPT (3)7 memiliki aktivitas protease alkalin tertinggi yaitu 0.254 U/ml pada inkubasi 24 jam. Isolat SPT (2)4 dan SPT (1)4 mempunyai aktivitas tertinggi masing-masing adalah 0,230 dan 0,127 U/ml pada inkubasi 30 jam. Hasil karakterisasi menunjukkan ketiga isolat adalah bakteri Gram positif, isolat SPT (3)7 berbentuk kokus, isolat SPT (2)4 dan SPT (1)4 berbentuk batang.*

*Kata kunci: alkalin protease, bakteri termofilik, sumber air panas.*

## **1. PENDAHULUAN**

Dewasa ini masalah lingkungan semakin tinggi sehingga para ahli dan pencintalingkungan memilih teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri [1]. Pemanfaatan enzim dalam skala industri saat ini telah menjadi komoditas penting yang diproduksi dan diperdagangkan di seluruh dunia, salah satunya adalah enzim protease.

Bakteri termofilik alkalin merupakan mikroba yang potensial memproduksi enzim protease yang stabil terhadap panas dan bersifat basa yang diperlukan dalam dunia industri. Enzim ini digolongkan ke dalam kelompok enzim hidrolase yang bekerja mengkatalisis reaksi-reaksi hidrolisa suatu substrat dengan bantuan molekul air. Protease juga memiliki nilai ekonomis yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Di dunia medis enzim protease digunakan sebagai terapi untuk pengobatan tumor, radang, kelainan darah dan pengaturan kekebalan [1]. Aplikasi protease alkalin termostabil telah digunakan secara komersial dalam industri deterjen, penyamakan kulit, farmasi, fotografi dan pengolahan limbah [2]. Penelitian ini bertujuan menyeleksi isolat bakteri dari sumber air panas Desa Sungai Pinang Kabupaten Kuantan Singingi, Riau dan melihat aktivitas enzim protease selama masa inkubasi yang bersifat alkalin dan termofilik.

## **2. METODE PENELITIAN**

### **2.1 Seleksi Isolat Bakteri Penghasil Protease Alkalin Termofilik**

Bakteri termofilik penghasil enzim hidrolitik merupakan isolat dari hasil penelitian sebelumnya [3]. Dua puluh lima isolat dilakukan peremajaan dan diseleksi pada media Luria Agar + kasein 1% pH 8, inkubasi pada suhu 50°C selama 72 jam untuk mendapatkan isolat penghasil protease alkalin termostabil [4]. Masing-masing isolat ditetesi dengan HCl 1% untuk melihat pembentukan zona bening. Tiga isolat hasil seleksi dengan nilai rasio Z/K tertinggi selanjutnya dilihat aktivitas enzim dan kurva pertumbuhan dari setiap isolat [5].

### **2.2 Penyiapan inokulum dan sumber enzim**

Sebanyak satu lup inokulasi biakan murni bakteri protease alkalik yang berasal dari medium penyimpanan diinokulasikan ke dalam 50 ml Media Luria Broth + kasein 1% pH 8, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 50°C [1] dengan alat pengocok horizontal untuk mendapatkan masing-masing isolat populasi  $10^8$  cfu/ml.

### 2.3 Persiapan Sumber Enzim dan Pengukuran Aktivitas Enzim Protease Alkalin

Sebanyak 1 ml inokulum ( $\pm 10^8$  sel/ml) dari masing-masing isolat bakteri penghasil enzim protease alkalin dimasukkan ke dalam 50 ml media Luria Broth + kasein 1 % pH 8 dalam erlenmeyer 100 ml yang diinkubasi pada suhu 50°C dengan kecepatan agitasi 170 rpm dengan variasi waktu inkubasi 6, 12, 18, 24, 30 dan 36 jam [1]. Masing-masing larutan hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan sel dan supernatannya. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan menurut metode Lowry dengan cara: sebanyak 0,5 ml supernatan ditambahkan 0,5 ml larutan 0,05 M buffer Tris-HCl pH 8 dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml kasein (1 % dalam 0,05 M larutan buffer Tris-HCl pH 8) dan diinkubasi kembali pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml Asam Trikhloroasetat (TCA) 0,4 M, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no 1. Sebanyak 0,5 ml filtrat ditambahkan dengan 2,5 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M, diinkubasi selama 10 menit kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen *Folin Ciocalteu* dan diinkubasi ulang selama 30 menit. Selanjutnya transmittan larutan dibaca pada panjang gelombang 660 nm dan sebagai standar digunakan tirosin. Hasil pengujian supernatan uji dikurangi dengan kontrol. Kontrol merupakan supernatan enzim dengan perlakuan yang sama, tetapi penambahan TCA dilakukan sebelum penambahan substrat. Satu unit aktivitas enzim protease alkalin dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1  $\mu\text{g}$  tirosin dalam 1 ml pada setiap menit kondisi pengukuran [6].

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Seleksi Isolat Bakteri Penghasil Protease Alkalin Termofilik

Dua puluh lima isolat bakteri yang diseleksi pada media pada media seleksi agar yang mengandung substrat susu skim, pH 8 diperoleh 6 isolat bakteri penghasil protease alkalin yang memiliki ratio Z/K antara 10.2 (mm) sampai 19.7 mm yang diinkubasi selama 72 jam pada suhu 50°C. Pada Tabel 1 dapat dilihat tiga isolat yang memiliki ratio zona bening

tertinggi, yaitu isolat SPT (1)4 zona bening 19.7 mm, SPT (2)4 zona bening 16.2 mm dan SPT (3)7 zona bening 13.0 mm.

Tabel 1. Nilai rasio Z/K dari 6 isolat hasil seleksi pada media Luria Agar + kasein 1% pH 8, suhu 50 °C pada inkubasi 72 jam.

No	Isolat	Zona bening (mm)		
		K	Z	Z/K
1	<b>SPT (1)4</b>	<b>18.0</b>	<b>35.0</b>	<b>19.7</b>
2	SPT (2)1	62.0	66.0	10.7
3	<b>SPT (2)4</b>	<b>37.0</b>	<b>60.0</b>	<b>16.2</b>
4	<b>SPT (3)7</b>	<b>30.0</b>	<b>39.0</b>	<b>13.0</b>
5	SPT (4)5	78.0	80.0	10.2
6	SPT (4)6	46.0	58.0	12.6

Keterangan:

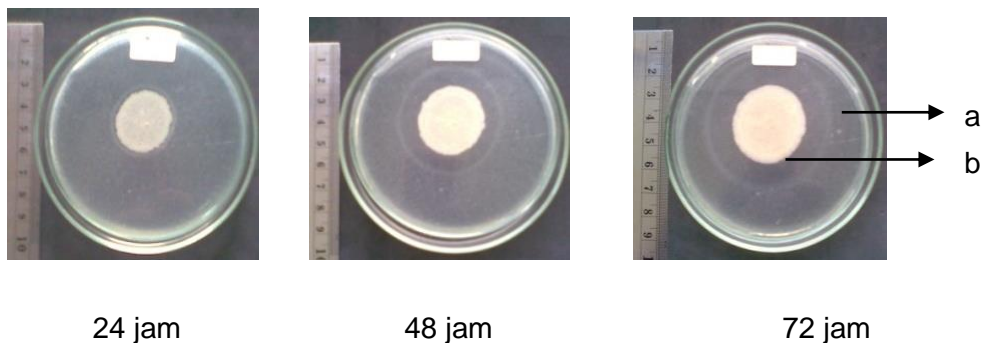
SPT : Sungai Pinang Termofilik

K : diameter koloni

Z : Zona bening

Produksi protease dipengaruhi oleh waktu, suhu, pH inkubasi [7]. pH 8 bagi enam isolat hasil seleksi ini menunjukkan pH terbaik untuk produksi protease ekstraseluler secara kualitatif. Kondisi ini dapat dilihat dari pertumbuhan dan aktivitas isolat proteolitik yang dihasilkan. Sebelumnya [3], isolat bakteri ini diseleksi bakteri proteolitik tersebut pada pH 7, diperoleh ukuran zona bening yang jauh lebih kecil dibandingkan nilai zona bening isolat hasil seleksi pada penelitian ini. Ukuran zona bening setelah 72 jam untuk isolat SPT (1)4 sebesar 25 mm, isolat SPT (2)4 sebesar 22 mm dan isolat SPT (3)7 sebesar 20 mm. Hasil penelitian [8] menunjukkan bahwa pH optimum enzim proteolitik yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* adalah 8,0-8,5. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan setiap bakteri dalam menghasilkan enzim protease alkalin berbeda-beda. Perbedaan ini diantaranya dapat dipengaruhi oleh suhu, pH media, jenis dan konsentrasi substrat.

Pada Gambar 1 aktivitas kualitatif protease dari salah isolat SPT 2(4) pada media seleksi agar yang mengandung substrat kasein diperlihatkan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri. Ukuran zona bening yang terbentuk bertambah sepanjang waktu inkubasi. Zona bening ini terbentuk karena isolat tersebut menghasilkan enzim protease, sehingga kasein dalam media akan dihidrolisis. Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk kalsium kaseinat [8].



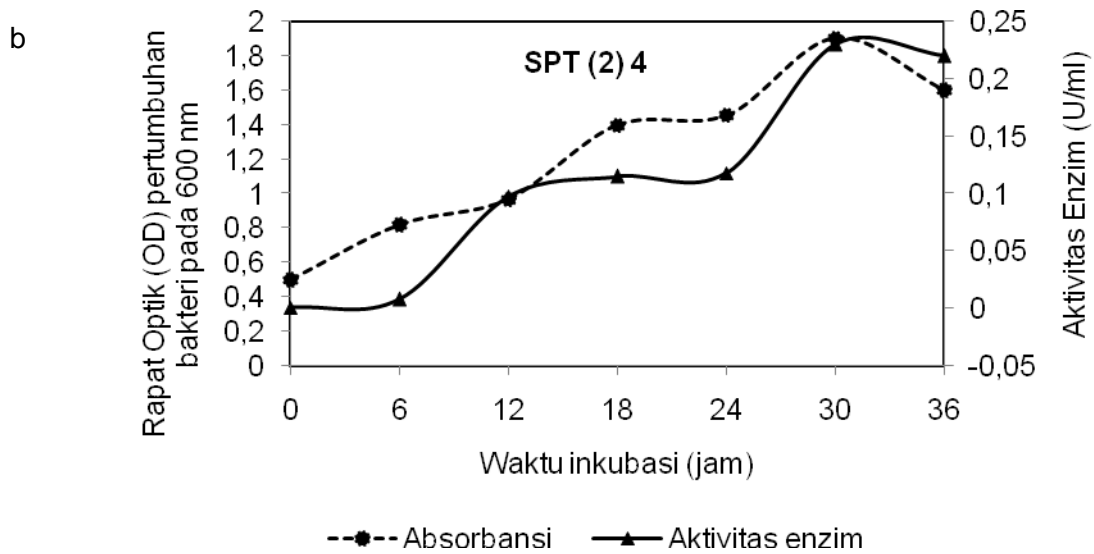
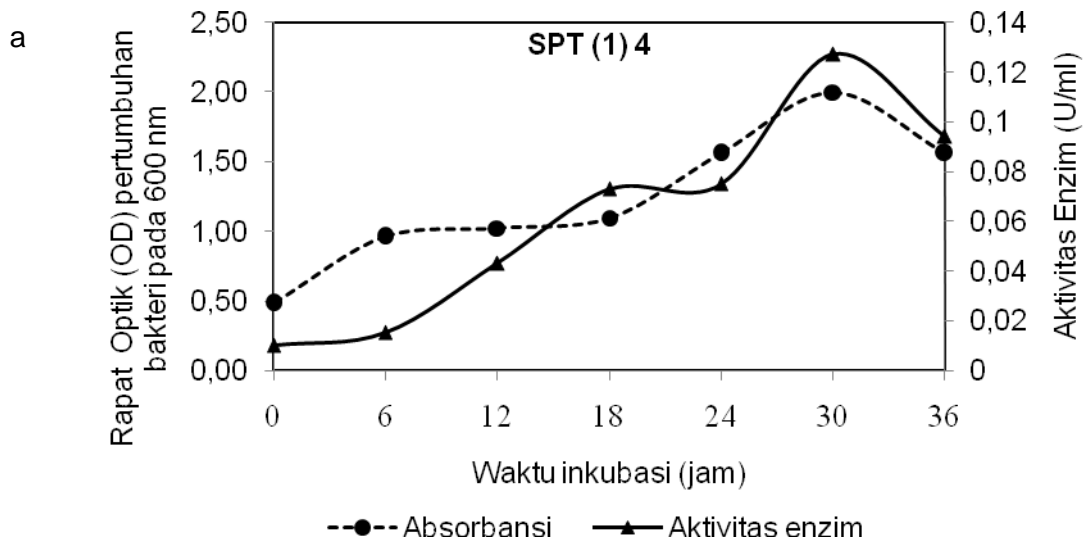
Gambar 1. Aktivitas protease alkalin dari isolat SPT(2)4 pada media LA + kasein 1%, pH 8, suhu 50 °C. a.zona bening dan b. koloni bakteri.

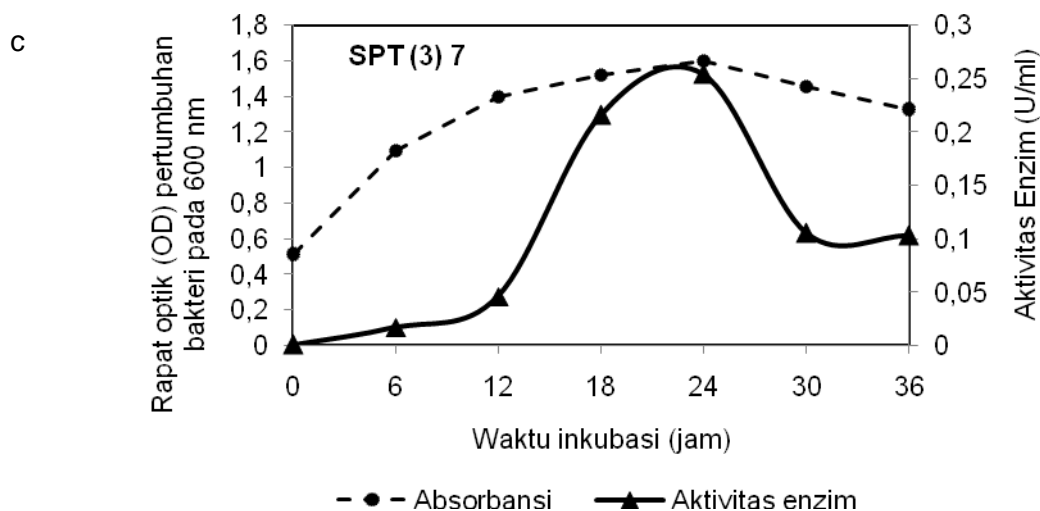
Isolat bakteri ini dikelompokkan pada bakteri termofilik alkalitoleran. Bakteri yang beradaptasi dengan kondisi alkali dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok yaitu bakteri alkalofilik tumbuh pada pH 9-10 dan bakteri alkalitoleran dapat tumbuh pada pH 7-8[9].

### 3.2 Aktivitas Enzim dan Kurva Pertumbuhan Dari Masing-Masing Isolat Bakteri Penghasil Protease Alkalin Termostabil

Pengujian aktivitas enzim dilakukan terhadap 3 isolat yang memiliki indeks proteolitik teratas. Isolat yang memiliki indeks proteolitik tinggi diuji aktivitasnya pada suhu 50°C dengan pH 8. Suhu 50°C merupakan suhu optimum bagi bakteri termofilik ini, dan mampu hidup pada pH 8. Bakteri termofilik berkisar antara 45-65°C [7]. Aktivitas enzim dan kurva pertumbuhan selama waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 2.

Aktivitas enzim protease alkalin termofilik tertinggi dari ketiga bakteri uji dihasilkan oleh isolat SPT (3)7 sebesar 0,254 U/ml pada inkubasi 24 jam. Hal ini sejalan dengan profil pertumbuhan isolat SPT (3)7 yang mempunyai peningkatan massa sel dan waktu generasi yang lebih cepat dibandingkan dua isolat lainnya. Berbeda untuk isolat SPT (1)4 dan SPT (2)4, aktivitas enzim protease tertinggi pada inkubasi 30 jam masing-masing sebesar 0,127 U/ml dan 0,230 U/ml sejalan dengan kurva pertumbuhannya yang mencapai fase log pada inkubasi 30 jam. Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan protease alkalin dipengaruhi oleh laju pertumbuhan bakteri tersebut.





Gambar 2. Profil pertumbuhan dan aktivitas enzim protease masing-masing isolat bakteri pada medium Luria Broth + kasein 1%, pH 8 dan suhu 50 °C selama rentang waktu inkubasi. a.SPT (1)4 b. SPT (2)4,c. SPT (3)7

Kondisi fermentasi merupakan faktor penting untuk menghasilkan enzim. Isolat SPT (1)4, SPT (2)4 dan SPT (3)7 yang ditumbuhkan pada lingkungan alkali menghasilkan aktivitas enzim protease akan lebih tinggi berbanding bila bakteri tersebut ditumbuhkan pada lingkungan netral. Mempertimbangkan aktivitas enzim maksimum diamati pada pH basa, proteasealkali termofilik berpotensi sebagai pembersih aditif dalam deterjen untuk memfasilitasi pelepasan protein. Hasil karakterisasi menunjukkan ketiga isolat adalah bakteri Gram positif, isolat SPT (3)7 berbentuk kokus, isolat SPT (2)4 dan SPT (1)4 berbentuk batang. Selain berpotensi menghasilkan enzim protease ketiga enzim ini juga mampu menghasilkan enzim amilase dan lipase [10].

#### 4. KESIMPULAN

Enam isolat bakteri terseleksi dapat menghasilkan enzim protease alkalin pada suhu 50°C dengan pH 8 melalui uji secara kualitatif. Tiga isolat bakteri yang mempunyai rasio Z/K tertinggi yaitu SPT (1)4 > SPT (2)4 > SPT (3)7. Pengukuran aktivitas enzim protease alkalin secara kuantitatif diperoleh aktivitas tertinggi berturut-turut adalah SPT (3)7 sebesar 0,254 U/ml pada inkubasi 24 jam dan SPT (2)4 dan SPT (1)4 pada inkubasi 30 jam, masing-masing sebesar 0,230 U/ml dan 0,127 U/ml.

## 5. DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Akhdiya A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil *Buletin Plasma Nutfah*, , 9 (2): 38-44.
- [2]. Anwar A, Salaemuddin M. 1998. "Alkaline Protease: A Review". *Journal Bioresource Technology* 64:175.
- [3]. Silaban DU. 2007. Isolasi dan Skrining Enzim Hidrolase Ekstraseluler Termofilik Asal Sumber Air Panas Desa Sungai Pinang Kabupaten Kuantan. [Skripsi]. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau. Pekanbaru.
- [4]. Fardiaz S. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. 1993. Jakarta: Penerbit Raja Grafindo Persada.
- [5]. Maryana. 2009. Seleksi dan Aktivitas Protease Alkalin Dari Bakteri Termofilik Alkalintoleran Asal Sumber Air Panas Sesa Sungai Pinang Kabupaten Kuantan Singingi. [Skripsi]. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau. Pekanbaru.
- [6]. Naiola E, Widhyastuti N. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp. *Berkala Penelitian Hayati* 13: 51-56.
- [7]. Soeka, YS, Rahayu, SH, Setianingrum N, Naiola E. 2011. Kemampuan *Bacillus Licheniformis* dalam Memproduksi Enzim Protease Yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Media Litbang Kesehatan* Volume 21 Nomor 2.
- [8]. Poernomo AT, Poerwanto DA. 2003. Uji Aktivitas "Crude" Enzim Proteolitik *Bacillus subtilis* FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah. *Majalah Farmasi Airlangga* 3 (3): 103-107.
- [9]. Ulukanlii Z. 2001. Alkaliphilic Microorganisms and Habitats. *Turkish Journal Biology* 26: 181-191.
- [10]. Linda, T.M. 2008. Isolation of Thermophilic Bacteria Which Production Hydrolitic Extracellular Enzym in Hot Water Resource Sungai Pinang Village Kuantan Singingi Regency. *Proceeding Seminar Internasional FMIPA UNRI – FST UKM ke-5*. ISBN 978-979-1222-46-4.