

DETEKSI AKTIVITAS PROTEOLITIK ISOLAT BAKTERI ASAL AMPAS TAHU PADA SUBSTRAT BEKATUL

Baital Izzatul Badriyah, Tri Ardyati

Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Jalan Veteran Malang, Jawa Timur, Indonesia

Email: baital.izza@gmail.com

ABSTRAK

Ampas tahu mengandung protein sebesar 23,7 % dan kemungkinan terdapat bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik dapat meningkatkan efisiensi penggunaan pakan ternak. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri proteolitik asal ampas tahu dan mempelajari aktivitas protease yang dihasilkan pada substrat bekatul. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga ulangan. Tahapan penelitian meliputi isolasi bakteri proteolitik dari ampas tahu, pengujian aktivitas bakteri proteolitik pada media *calcium caseinate agar* (CCA), karakterisasi bakteri, uji patogenisitas, pembuatan kurva pertumbuhan dan pengujian aktivitas proteolitik bakteri pada media bekatul 2 %. Data luas zona bening pada media CCA dianalisis ragam (Anova) dan dilanjutkan dengan uji Tukey, sedangkan aktivitas protease isolat bakteri pada media bekatul 2 % dianalisis dengan uji *Independent Sample T* ($\alpha = 0,05$). Sepuluh isolat bakteri proteolitik diperoleh dari ampas tahu dengan isolat TP5K1 dan TP6K5 memiliki aktivitas proteolitik (zona bening) terbesar serta tidak patogen. Aktivitas protease tertinggi pada media bekatul 2 % untuk isolat TP5K1 sebesar 2,24 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri $5,13 \times 10^7$ sel/mL, sedangkan isolat TP6K5 sebesar 2,37 Unit/mL dengan jumlah sel bakteri $5,26 \times 10^7$ sel/mL.

Kata kunci: aktivitas protease, ampas tahu, bakteri, bekatul

ABSTRACT

Tofu waste contains 23.7 % of protein and possible containing proteolytic bacteria. Proteolytic activity of bacteria could increase the efficiency of feed utilization. This research was carried out in order to get isolates bacteria in tofu waste having proteolytic activity and to study proteolytic activity that produced in rice bran substrate. Methods used in this research were isolation of proteolytic bacteria from tofu waste, assay of bacterial protease activity on the calcium caseinate agar (CCA) medium, characterization of pathogenicity, preparation of bacterial growth curve and protease activity assay was performed in 2 % of rice bran medium. The wide of clear zone data of isolates bacteria were analyzed using Analysis of Variance (Anova) and continued by Tukey's Test ($\alpha = 0.05$), whereas protease activity of isolates bacteria on 2 % rice bran medium were analyzed using Independent Sample T-Test ($\alpha = 0.05$). Ten isolates of proteolytic bacteria obtained from tofu waste and isolates TP5K1 and TP6K5 have the greatest proteolytic activity (clear zone) and no pathogens. The highest protease activity of isolate TP5K1 was 2.24 Unit/mL with the cell number of bacteria is 5.13×10^7 cell/mL, whereas the highest protease activity of isolate TP6K5 was 2.37 Unit/mL with the cell number was 5.26×10^7 cell/mL.

Key words: bacteria, protease activity, rice bran, tofu waste

PENDAHULUAN

Eksplorasi bakteri yang potensial untuk diaplikasikan dalam bidang industri perlu dilakukan secara terus menerus [1]. Salah satu produk industri yang penting dan bernilai tinggi yang dihasilkan oleh bakteri adalah enzim. Adanya bakteri yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim

[2]. Enzim memegang peranan penting dalam dunia industri, salah satu di antaranya yaitu protease [3].

Protease merupakan enzim yang digunakan secara luas pada industri pakan ternak dan telah hampir mencapai 65 % dari total penjualan enzim di dunia [4]. Salah satu fungsi protease yaitu berperan dalam degradasi protein menjadi asam amino, sehingga

menjadikan pakan ternak lebih mudah diserap oleh pencernaan hewan ternak [5]. Penggunaan enzim pada pakan ternak ditujukan untuk mengurangi faktor-faktor antinutrisi dalam pakan, meningkatkan daya cerna pakan, meningkatkan ketersediaan zat-zat gizi tertentu, serta mengurangi masalah polusi kotoran ternak [6].

Salah satu sumber bakteri yang berpotensi memiliki aktivitas proteolitik yaitu ampas tahu yang mengandung protein sebesar 23,7 % [7]. Bakteri asal ampas tahu perlu diketahui potensi aktivitas proteasenya karena dapat diaplikasikan pada industri pakan ternak sebagai campuran bekatul. Bekatul mengandung protein 11,5-17,2 % [8]. Melihat potensi aplikasi bakteri proteolitik yang menjanjikan pada bidang industri pakan ternak, maka penelitian ini penting untuk dilakukan. Hal ini dilakukan agar diperoleh isolat bakteri yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan aktivitas proteolitik dan dapat diaplikasikan pada pakan ternak (bekatul).

METODE PENELITIAN

Isolasi, Pemurnian, dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik dari Ampas Tahu. Ampas tahu diperoleh dari Pabrik Tahu 73 Sukun-Malang. Bakteri proteolitik diisolasi menggunakan media *calcium caseinate agar* (CCA) dengan metode *pour plate*. Isolat bakteri proteolitik yang menghasilkan zona bening dimurnikan hingga diperoleh koloni tunggal dan ditumbuhkan pada media agar miring sebagai stok [9]. Isolat bakteri proteolitik dikarakterisasi secara makroskopis yaitu pengamatan karakter morfologi serta dikarakterisasi secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram dan endospora, uji katalase dan uji oksidase.

Uji Kualitatif Aktivitas Protease Isolat Bakteri. Uji aktivitas protease isolat bakteri proteolitik pada media CCA menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga ulangan. Data luas zona bening dianalisis ragam (Anova) dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Luas zona bening yang terbentuk di sekitar koloni diukur menggunakan jangka sorong digital [10].

Uji Patogenisitas. Satu oose kultur murni bakteri berumur 24 jam digores pada media *blood agar* dengan metode *streak plate*.

Isolat bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam [11]. Medium di sekitar koloni diamati ada atau tidak zona bening yang menunjukkan aktivitas hemolis/patogen.

Starter Isolat Bakteri Proteolitik pada Media Bekatul. Satu oose isolat bakteri proteolitik diinokulasikan ke dalam 10 mL media *calcium caseinate broth* (CCB) dan diinkubasi pada suhu 37 °C, 120 rpm, dan 24 jam. Lima mililiter kultur bakteri diinokulasikan ke dalam 45 mL media bekatul sebagai stok inokulum dan diinkubasi pada suhu 37 °C, 120 rpm, selama 24 jam. Lima belas mililiter kultur dengan densitas 10⁷ sel/mL bakteri diinokulasikan ke dalam 135 mL media bekatul 2 % dan diinkubasi pada suhu 37 °C, 120 rpm, 48 jam. Suspensi kultur bakteri pada jam ke 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 dan 48 dihitung menggunakan hemositometer. Suspensi kultur bakteri pada fase pertumbuhan logaritmik dengan densitas yang diharapkan digunakan sebagai starter [12].

Deteksi Aktivitas Protease Isolat Bakteri pada Substrat Bekatul 2 %. Uji aktivitas protease dilakukan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga ulangan. Data aktivitas proteolitik dianalisis dengan uji *Independent Sample T*. Aktivitas protease dideteksi dengan cara lima mililiter sampel bakteri dalam media produksi yaitu jam ke 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 dan 48 disentrifugasi pada 10.000 rpm, 15 menit, 4 °C. Supernatan sebanyak 500 µL ditambahkan dengan 500 µL 0,05 M buffer fosfat pH 7. Suspensi dipreinkubasi pada suhu 37 °C selama lima menit dan ditambahkan substrat sebanyak 500 µL (dua persen kasein dalam 0,05 M buffer fosfat pH 7). Larutan enzim diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit kemudian ditambah satu mililiter 0,4 M asam trikloroasetat (TCA) dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm, selama 15 menit, pada suhu 4 °C. Supernatan (*crude enzyme*) diambil satu mililiter kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diencerkan dengan Tris HCl hingga total volume menjadi dua mililiter. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm. Nilai aktivitas protease diukur dari kadar tirosin yang diperoleh pada kurva baku tirosin menurut rumus [13].

$$\text{Aktivitas enzim} = [\text{tirosin}] \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

v : volume total sampel percobaan pada tiap tabung (mL); p : jumlah enzim (mL); q: waktu inkubasi (menit) dan fp: faktor pengenceran.

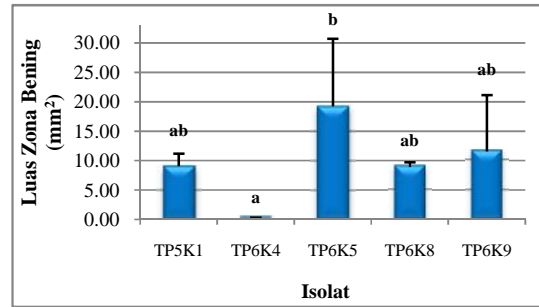
HASIL DAN PEMBAHASAN

Lima isolat bakteri dari ampas tahu yang memiliki aktivitas proteolitik yaitu TP5K1, TP6K4, TP6K5, TP6K8, dan TP6K9 (Gambar 1). Adanya aktivitas protease ekstraseluler bakteri menyebabkan kasein pada media CCA terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino. Zona bening merupakan indikator bahwa isolat bakteri mampu memanfaatkan kasein pada media sebagai sumber nutrisinya [14].

Dua isolat TP5K1 dan TP6K5 dipilih karena tidak patogen yang ditunjukkan tidak menghasilkan aktivitas hemolisis (tidak ada zona bening) di sekitar koloni pada media *blood agar*. Kedua isolat bakteri termasuk dalam hemolisis -, yaitu tidak mampu menghemolisis darah [15]. Isolat TP5K1 berbentuk batang ($p = 1,5 \mu\text{m}$) sedangkan TP6K5 berbentuk bulat ($p = 1 \mu\text{m}$), tetapi keduanya Gram positif dan tidak membentuk endospora (Tabel 1). Kedua isolat menunjukkan katalase positif dan oksidase negatif yang menunjukkan bersifat aerob [16]. Tabel 1. Karakter pertumbuhan isolat bakteri proteolitik asal ampas tahu

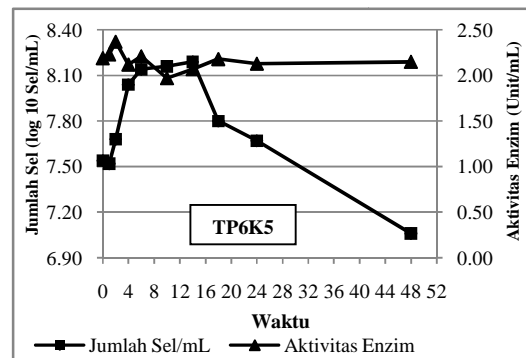
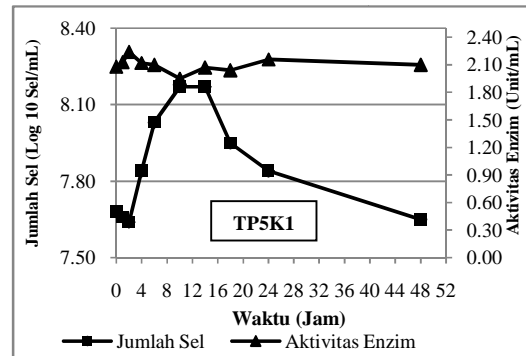
| Karakter | Koloni | |
|-------------------------------------|--------|-------|
| | TP5 K1 | TP6K5 |
| Bentuk koloni: - Bulat | + | - |
| - Tidak teratur | - | + |
| - Menyeluruh | + | - |
| - Lobate | - | + |
| Permukaan koloni: - <i>Smooth</i> | + | - |
| Konfigurasi koloni: - <i>Lobate</i> | - | + |
| Elevasi: - <i>Raised</i> | + | - |
| - <i>Flat</i> | - | + |
| Konsistensi koloni: | | |
| - Seperti mentega | + | + |
| Ciri optik koloni: - Berkilat | + | + |
| Warna koloni: - Kuning | + | + |
| Gram | + | + |
| Membentuk Endospora | - | - |
| Katalase | + | + |
| Oksidase | - | - |
| Patogenisitas | - | - |
| Hidrolisis protein | + | + |

Keterangan: (+) memiliki dan (-) tidak memiliki karakter yang disebutkan



Gambar 1. Luas zona bening isolat bakteri proteolitik pada media CCA

Aktivitas protease isolat bakteri TP5K1 dan TP6K5 tidak berbeda selama masa inkubasi ($p > 0,05$). Aktivitas protease tertinggi pada isolat TP5K1 sebesar 2,24 Unit/mL dan isolat TP6K5 sebesar 2,37 Unit/mL yang terjadi pada jam kedua (awal fase logaritmik) dengan jumlah sel secara berturut-turut sebanyak $7,64 \times 10^7$ sel/mL dan $7,68 \times 10^7$ sel/mL (Gambar 2). Bakteri memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi pada fase logaritmik karena sel berada dalam kondisi optimum untuk metabolisme dan perkembangbiakan [17].



Gambar 2. Kurva pertumbuhan dan aktivitas protease isolat bakteri proteolitik pada media bekatul 2 %

Protease dari mikroba merupakan enzim konstitutif atau inducibel parsial. Enzim konstitutif selalu tersedia di dalam sel mikroba

dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif disintesis bila ada induksi substrat dalam medium. Sintesis enzim induktif meningkat seiring peningkatan konsentrasi substrat terutama bila substratnya merupakan satu-satunya sumber karbon [18].

Komposisi media, pH, dan aerasi merupakan variabel penting yang memengaruhi produksi enzim pada *submerged fermentation* [19]. Penurunan aktivitas proteolitik bakteri dapat terjadi karena berkurangnya jumlah substrat [20]. Penurunan aktivitas protease yang ditunjukkan oleh isolat TP5K1 dan TP6K5 kemungkinan akibat konsentrasi protein yang terkandung pada media bekatul 2 % terlalu sedikit sehingga cepat habis. Jika konsentrasi substrat rendah maka enzim tidak mencapai aktivitas maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan [21]. Aktivitas protease meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat sampai pada konsentrasi maksimum. Kecepatan reaksi juga akan meningkat dengan makin cepatnya substrat terikat pada enzim [22].

KESIMPULAN

Dua isolat TP5K1 dan TP6K5 diantara lima isolat bakteri dari ampas tahu memiliki aktivitas proteolitik tertinggi pada media CCA dan tidak patogen. Isolat TP5K1 dan TP6K5 memiliki aktivitas protease secara berturut-turut 2,24 Unit/mL dengan jumlah sel $5,13 \times 10^7$ sel/mL dan 2,37 Unit/mL dengan jumlah sel $5,26 \times 10^7$ sel/mL.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada Suharjo dan Osfar Sjojfan yang telah banyak membantu dalam proses penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Sutandi, C. 2003. Analisis Potensi Enzim Protease Lokal. <http://repository.ipb.ac.id>. Diakses tanggal 21 April 2012.
- [2]. Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. Buletin Plasma Nutfah. Vol.9 No.2.
- [3]. Muchtadi, S., Nurleni & Made. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. Institut Pertanian Bogor. Bandung.

- [4]. Huang, G., Ying, T., Huo, P. & Jiang, J. 2006. Purification and characterization of a protease from thermophilic *Bacillus* strain HS08. *Biotechnol.* 5:2433-2438.
- [5]. Kurniawati, W. 2008. Implementasi hasil penelitian Biologi. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sebelas Maret. Surakarta. Skripsi.
- [6]. Gunoro, S., Yasa, I. M. D. R., Suyasa, N. & Parwati, I. A. P. 2000. Pengaruh Penggunaan Enzim Terhadap Produktivitas Telur Ayam Buras. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner.
- [7]. Siregar, S. 1995. Sapi Perah: Jenis, Teknik Pemeliharaan dan Analisis Usaha. Penebar Swadaya: Jakarta.
- [8]. Damayanthi, E., Tjing, L. T. & Arbianto, L. 2007. Rice Bran. Panebar Swadaya. Depok.
- [9]. Cappuccino, J. G. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Addison-Wesley: USA.
- [10]. Amelia, G., Rini, H., Iwan, S., Tatik, K. & Abdul, C. 2005. Isolasi dan pengujian aktivitas enzim amilase dan protease mikroba terasi asal Kalimantan Timur. Laporan Teknik. Bidang Mikrobiologi. Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bogor.
- [11]. Chang, Chin-I., Wen-Yu Liu & Chung-Zen Shyu. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.* 43:153-157.
- [12]. Saxena, R. & Singh, R. 2011. Characterization of a metallo-protease produced in solid state fermentation by a newly isolated *Bacillus* strain. *Acta Biologica Szegediensis.* 55(1):13-18.
- [13]. Enggel, J., Meriandini, A. & Natalia, L. 2004. Karakterisasi protease ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia.* 9(1): 9-12.
- [14]. Widhyastuti, N. & Dewi, R. M. 2001. Isolasi bakteri proteolitik dan optimasi produksi protease. Laporan Teknik Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya Hayati. Pusat penelitian Biologi. LIPI.

- [15]. Port, T. 2008. Blood Agar (BAP) Bacterial Growth Medium Differential Medium to Identify *-hemolytic Streptococcus*. <http://suite-101.com/>. Diakses tanggal 02 Januari 2013.
- [16]. Marlina. 2009. Identifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan metode biolog dan deteksi gen ToxR nya secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. Vol. 13. No. 1.
- [17]. Yunita, S. P. 2012. Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri dari Limbah Rumah Pematangan Hewan. Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga. Jurnal Skripsi.
- [18]. Lidya & Djenar. 2000. Dasar Bioproses Direktorat Pembinaan dan Fenolinin dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional: Jakarta.
- [19]. Maurer, K. 2004. *Cur. Opin. Biotechnol.* 15:330-334.
- [20]. Pakpahan, R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Bakteri Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Tesis.
- [21]. Pelczar, M. J. & Chan, E. C. S. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
- [22]. Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga: Jakarta.