

Isolasi, Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Potensial Penghasil Protease dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir Sampah Akhir (TPAS) Talang Gulo Jambi

Hafiz Muchti Kurniawan¹, Lovera Anggraini²

^{1,2} Universitas Adiwangsa Jambi

Corresponding author : hafezkurniawan84@gmail.com

ABSTRACT

Protease (E.C.3.4) merupakan enzim yang mampu mendegradasi protein dengan memutus ikatan polipeptida pada protein melalui reaksi hidrolisis yaitu suatu reaksi yang menambahkan satu molekul air. Tujuan dari penelitian ini adalah mengeksplorasi sumber-sumber produksi enzim protease yang baru dari mikroorganisme terutama bakteri yang diisolasi dari tanah Tempat Pembuangan Akhir Sampah (TPAS) Talang Gulo, Jambi. Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksploratif dan eksperimental yang terdiri dari tiga tahap yaitu pengambilan sampel tanah di Tempat Pembuangan Akhir Sampah (TPAS) Talang Gulo, Isolasi dan Seleksi bakteri penghasil protease, Karakterisasi bakteri penghasil protease. isolasi dan seleksi dilakukan dengan metode dilution dan karakterisasi dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia. 120 isolat berhasil diisolasi dari tanah TPAS Talang Gulo Jambi dan 50 Isolat menunjukkan indikasi mampu menghasilkan protease. Isolat dengan kode TG-50 memiliki nilai indeks proteolitik tertinggi yaitu 3,00. Hasil karakterisasi dan uji biokimiawi terhadap isolat TG-50 menunjukkan bahwa isolat ini mengarah pada genus Bacillus dengan ciri mikroskopis gram +, bentuk sel Rod (batang) dan positif pada uji hidrolisa Pati, Hidrolisa kasein dan uji katalase sedangkan pada uji selulosa negatif.

Introduction

Protease merupakan enzim golongan hidrolase yang berperan dalam reaksi pemecahan ikatan peptida pada molekul protein, menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, melalui reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini mengkatalisis reaksi hidolisis, yaitu reaksi yang menambahkan satu molekul air untuk memecah ikatan peptide pada protein (Rao *et al*, 2008).

Protease merupakan enzim yang berperan penting dalam dunia industri dan tercatat hampir 60 % perdagangan enzim didunia didominasi protease (Moreira *et al*, 2002). Saat ini, perdagangan enzim didunia diperkirakan mencapai 4,2 triliun dollar. Protease merupakan satu dari tiga kelompok enzim yang diperkirakan perdagangannya akan

terus tumbuh mencapai 2,21 triliun dollar pada tahun 2021 (Suberu *et al*, 2019).

Protease banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri baik pangan maupun non pangan. Dalam industri pangan, protease digunakan untuk menjernihkan bir, melunakan daging, memperbaiki tekstur adonan roti dan lain-lain (Rao, 2008) sedangkan pada industri nonpangan digunakan sebagai zat additif detergen dalam membersihkan noda. Alkalin Protease asal isolat *Salinicoccus sp.* UN-12 kelompok *Halotoleran* mampu bersinergitas dengan detergen membersihkan serat kain dan tahan terhadap zat surfaktan detergen (Mokashe, Chauduri & Patil, 2017). Selain itu, kelompok enzim protease, misalnya kolagenase atau subtilisin, digunakan untuk

perawatan luka bakar dan protease alkalin yang menggantikan tripsin asal hewan (Rao *et al.*, 2008).

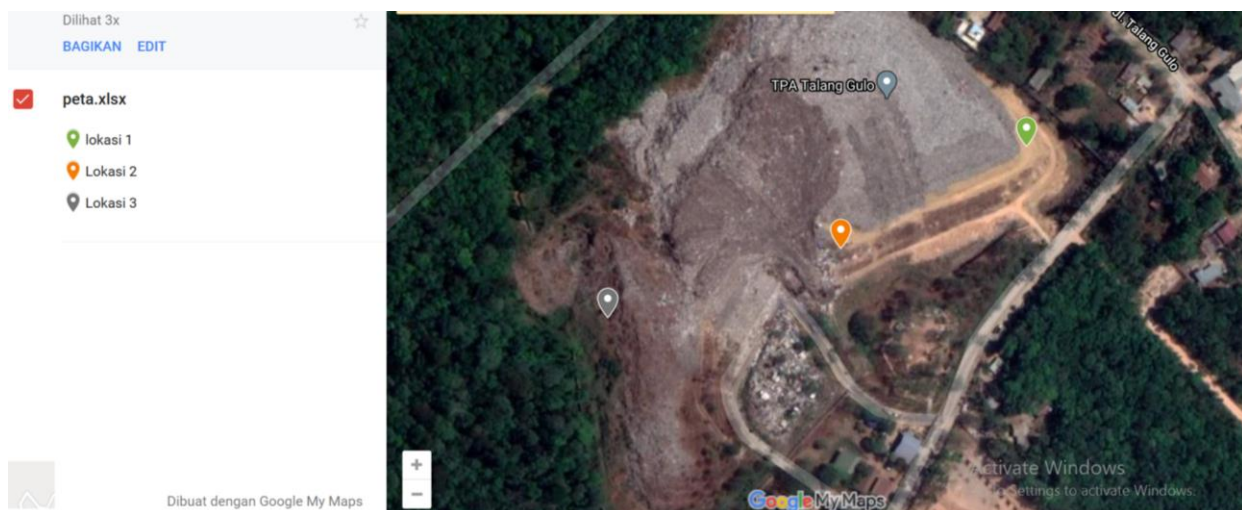
Isolasi karakterisasi mikroba penghasil protease telah berhasil dilakukan dari tanah di Arba Minch University, Ethiopia. Hasil isolasi menunjukkan dari 131 isolat 13 diantaranya (10%) merupakan penghasil protease. IS-4 merupakan isolat yang memiliki diameter zona bening terbesar (10.5 mm) dan memiliki karakteristik koloni halus, warna koloni keputihan, bentuk koloni bulat, elevasi datar. Uji fisiologi dan biokimia menunjukkan isolat IS-4 gram positif dan penghasil spora, kokus, katalase positif dan motil. (Abrar Hamza, 2017). Bakteri penghasil protease juga telah berhasil diisolasi dari tanah Distrik Kohat, Pakistan. 12 isolat ditemukan penghasil protease, hasil uji biokimia dan pewarnaan gram menunjukkan bahwa isolat tersebut bergenus *Bacillus* (Shah *et al.*, 2014). Penelitian lain menunjukkan bakteri penghasil protease berhasil diisolasi dari tanah tempat pengolahan ikan di Ethiopia. Protease yang berhasil diproduksi dimanfaatkan untuk pembuatan Poliester. (Abrar Hamzah, 2017)

Target yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah ditemukannya bakteri unggul (potensial) yang mampu menghasilkan enzim protease yang berguna untuk berbagai aplikasi di bidang industri yang selanjutnya pada penelitian berikutnya tim peneliti akan menggunakan bakteri ini untuk memproduksi protease serta mengoptimasi lingkungan ekstrinsiknya guna mendapatkan produksi protease yang maksimal.

Materials and Methods

Pengambilan sampel

Sampel tanah diambil dari tempat pembuangan akhir sampah (TPAS) Talang Gulo pada 3 titik pengambilan sampel di lokasi yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada gambar 1. dengan menggunakan Silinder crop yang ditancapkan kedalam tanah 10 cm kemudian sampel dikoleksi dan dimasukkan kedalam botol steril, kemudian dilakukan pengukuran terhadap suhu, pH dan dilakukan pencatatan sifat fisika tanah seperti warna tanah dan vegetasi tanaman yang tumbuh disekitar pengambilan sampel. Sampel dibawa ke laboratorium untuk dianalisa lebih lanjut.



Gambar 1. Lokasi Pengambilan sampel (-1.684606356507933, 103.61747713739489)

Isolasi dan seleksi isolat potensial penghasil protease

Isolasi Bakteri tanah dilakukan dengan menimbang sampel tanah 10 g kemudian dimasukkan kedalam 90 ml medium Nutrient Broth (NB), kemudian diinkubasi 24-48 Jam pada suhu 37⁰ C, kemudian dilakukan pengenceran menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,8 % hingga 10⁻¹² lalu masing-masing pengenceran 10⁻⁸ – 10⁻¹² diambil 0,1 ml untuk di spread plate pada medium Nutrien Agar (NA). isolat yang didapatkan diidentifikasi berdasarkan karakteristik yang mangacu pada *Bergey's manual of Determinative of Microorganism* (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994). Seleksi dilakukan dengan menginokulasikan semua koloni tunggal yang tumbuh kedalam medium *Skim Milk Agar* (SMA) dengan cara sebanyak satu ose koloni tunggal ditotol pada medium SMA menggunakan tusuk gigi. Bakteri yang membentuk zona bening hasil seleksi diukur kemampuan proteolitiknya berdasarkan indeks proteolitiknya (IP). Rumus penghitungan IP

Rumus IP = a/b

a = Diameter Zona Bening

b = Diameter Koloni (Muchi Kurniawan, 2017)

isolat dengan indeks proteolitik terbesar dipilih dan diseleksi untuk studi lebih lanjut.

Karakterisasi isolat potensial

Karakterisasi terhadap isolat unggul dilakukan dengan mengamati bentuk morfologi dan uji biokimiawi yang mengacu pada *Bergey's Manual od Determinative Bacteriology* (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994). Pengamatan morfologi yang dilakukan adalah bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni dan bentuk sel, sifat gram, endospora (Romadhon *et al*, 2012) Uji biokimia yang dilakukan adalah hidrolisa pati, hidrolisa protein, hidrolisa lemak, hidrolisa selulosa dan uji katalase.

Pewarnaan gram dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat bakteri kemudian dioleskan pada kaca objek. Isolat bakteri ditetesi kristal violet dibiarkan selama 1 menit

selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi alkohol 96 % selama 30 detik, dialiri air dan dikeringkan. Selanjutnya isolat bakteri ditetesi safranin selama 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan, kemudian preparat di amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x (Yulvizar, 2015).

Pewarnaan endospora dilakuka dengan menyiapkan preparat ulas menggunakan kaca objek, kemudian difiksasi diatas api bunsen. Preparat ditutup dengan kertas saring dan ditetesi malachite green, kemudian preparat diletakan diatas kawat yang dipanaskan dengan uap air selama 5 menit. Preparat ditetesi safranin lalu didiamkan selama 60 detik lalu dicuci dengan air. Preparat diamati di bawah mikroskop (Misgiyarta & Widowati, 2008).

Uji Katalase dilakukan dengan membuat olesan isolat bakteri pada kaca objek. Lalu ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3 %. Diamati terbentuknya gelembung gas pada preparat, jika terdapat gelembung gas berarti uji katalase tersebut positif (Yulvizar, 2015)

Uji motilitas dilakukan dengan sebanyak 1 ose isolat bakteri diambil kemudian ditusukkan kedalam medium NA semi padat pada tabung reaksi menggunakan jarum ose tusuk steril. Lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar dan uji negatif jika pertumbuhan bakteri tidak menyebar (Yulvizar, 2015)

Results and Discussion

Isolasi Bakteri Tanah Tempat Pembuangan Akhir Sampah Talang Gulo Jambi

120 isolat bakteri Tanah TPAS telah berhasil diisolasi. 48 isolat berhasil diisolasi dari lokasi I dengan pH 8 sedangkan 37 isolat berhasil diisolasi dengan pH 6 dan Lokasi III berhasil diisolasi 35 Isolat dengan pH 6.

Kondisi biotik dan abiotik sangat mempengaruhi kelimpahan bakteri tanah, dedaunan yang gugur, ranting dahan, biji rerumputan, serbuk sari, sampah organik rumah tangga, serbuk sari dan bangkai

serangga dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi oleh bakteri yang hidup dalam tanah tersebut (Rao *et al*, 2018)

Faktor abiotik juga sangat berperan penting dalam kelimpahan bakteri tanah, faktor fisika dan kimia tanah sangat berpengaruh terutama ketersediaan *trace element* berupa kalsium, magnesium dan besi merupakan elemen alami yang dibutuhkan bakteri dalam metabolisme, nitrat digunakan juga sebagai aksi kofaktor pada reaksi enzimatik dan sulfat dibutuhkan sel sebagai sumber unsur sulfur. Pada bakteri pembentuk spora, konsentrasi kalsium tinggi pada spora dan kalsium berikatan dengan asam dipikolat yang berfungsi melindungi DNA (Sari & Mukhsin, 2015)



Gambar 2. Tumbuhan yang hidup dan daun-daun yang gugur di tempat pengambilan sampel

Hasil pengukuran pH terhadap tanah dengan perbedaan lokasi pengambilan sampel menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara lokasi I dengan lokasi 2 dan 3 hal ini menggambarkan komposisi bahan kimia yang berbeda pula dan keadaan ini mengakibatkan perbedaan diversitas mikroorganismenya.

II. Penapisan Bakteri Tanah Tempat Pembuangan Akhir Sampah Penghasil Protease

Hasil penapisan yang telah dilakukan terhadap kemampuan isolat bakteri tanah TPAS Talang Gulo pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) menunjukkan bahwa 50 Isolat dari 120 isolat mampu mendegradasi protein yang ada didalam medium SMA dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. Hal ini mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim protease. Zona bening merupakan zona hasil degradasi protein dalam medium tersebut. Adanya zona bening dalam medium yang mengandung protein mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim protease (Mukti Kurniawan, 2015). Zona bening terbentuk akibat bakteri mensekresikan enzim protease pada medium SMA dan menghidrolisis kasein sehingga partikel kasein menghilang dan medium menjadi lisis (bening) dan terkonversi menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang larut (Melliawati, 2015)

III. Pengukuran Indeks Proteolitik (IP) Isolat Bakteri penghasil Protease

Tabel 1. Hasil Pengukuran Indeks Proteolitik.

Lokasi Pengambilan sampel	Kode Isolat	Proteolitik		
		Ø Koloni (mm)	Ø Koloni (mm)	IP
Lokasi I	TG-01	6,0	7,0	0,16
	TG-02	2,0	2,9	0,40
	TG-03	1,0	1,7	0,70
	TG-04	1,0	2,0	1,00
	TG-05	5,0	6,0	0,20
	TG-06	1,3	2,0	0,50
	TG-07	0,7	1,8	1,50

Isolasi, Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Potensial Penghasil Protease dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir Sampah Akhir (TPAS) Talang Gulo Jambi

	TG-08	4,7	5,8	0,23
	TG-09	7,0	7,5	0,02
	TG-10	6,7	8,0	0,19
	TG-11	7,0	7,4	0,05
	TG-12	7,0	8,0	0,17
	TG-13	5,7	6,5	0,14
	TG-14	5,6	6,7	0,19
	TG-15	4,5	5,2	0,15
	TG-16	6,5	7,5	0,15
	TG-17	1,0	2,0	1,00
	TG-18	7,8	8,5	0,08
	TG-19	3,6	4,5	0,25
	TG-20	1,3	1,9	0,70
	TG-21	0,7	1,8	1,50
	TG-22	1,0	1,7	0,70
	TG-23	1,4	2,5	0,80
	TG-24	7,8	8,5	0,08
	TG-25	5,0	6,0	0,20
	TG-26	1,0	2,0	1,00
	TG-27	4,7	5,8	0,23
	TG-28	5,7	6,5	0,14
	TG-29	2,2	3,9	0,70
	TG-30	7,0	7,4	0,05
Lokasi II	TG-31	7,0	7,4	0,05
	TG-32	1,4	3,9	1,70
	TG-33	3,5	5,0	0,40
	TG-34	5,7	6,5	0,14
	TG-35	0,7	1,8	1,50
	TG-36	1,3	1,9	0,70
	TG-37	0,7	1,8	1,50
	TG-38	0,9	2,3	1,50
	TG-39	0,6	1,6	1,60
	TG-40	1,3	1,9	0,70
	TG-41	0,7	1,8	1,50
	TG-42	0,5	1,2	1,40
	TG-43	1,4	3,9	1,70
Lokasi III	TG-44	5,7	6,5	0,14
	TG-45	4,7	5,8	0,23
	TG-46	1,3	1,9	0,70
	TG-47	5,7	6,5	0,14
	TG-48	1,3	1,9	0,70
	TG-49	0,7	1,8	1,50
	TG-50	0,5	2,00	3,00

Berdasarkan hasil pengukuran IP dapat diketahui bahwa 23 Isolat bakteri penghasil protease berasal dari lokasi I, sedangkan 15 isolat berasal dari Lokasi II dan 12 Isolat berasal dari lokasi III. Hasil skrining terhadap bakteri tanah TPAS Talang Gulo Jambi diperoleh 1 isolat bakteri proteolitik

terpilih yang memiliki IP tertinggi yakni Isolat dengan Kode TG-50 dengan nilai IP 3,00. Selanjutnya isolat TG-50 akan difokuskan untuk dilakukan karakterisasi. Pengamatan makroskopis isolat TG-50 disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Isolat TG-50 pada medium *Skim Milk Agar* (SMA)

IV. Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis Isolat TG-50

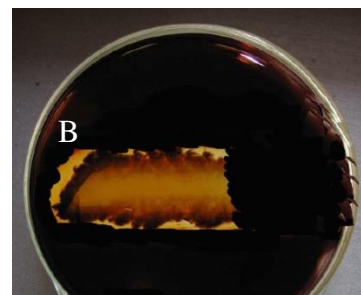
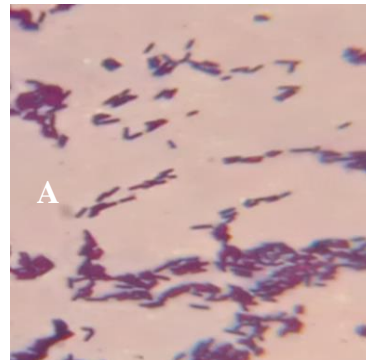
Hasil karakterisasi makroskopis dan mikroskopis disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakter Morfologi Isolat TG-50

Karakter	Hasil Pengamatan
Makroskopis	
- Bentuk koloni	Bulat
- Warna koloni	Putih Mengkilat
- tekstur	Undulated
Mikroskopis	
- Sifat gram	Positif
- Bentuk sel	Basil (batang)
- Endospora	tidak
Motilitas	+
Uji Biokimiawi sederhana	
- Hidrolisa Pati	+
- Hidrolisa Kasein	+
- Hidrolisa Selulosa	-
- Katalase	+

Berdasarkan hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis isolat TG-50 diketahui bahwa isolat TG-50 menunjukkan ciri-ciri mikroskopis yang mengarah pada genus *Bacillus*. Ciri-ciri mikroskopis yang dimiliki oleh genus *Bacillus* adalah bentuk sel batang, menghasilkan endospora, bersifat gram positif (Lestari., *et al*, 2018). Sedangkan ciri-ciri umum genus *Bacillus* adalah mampu menghidrolisis pati, lipid dan kasein, positif pada uji katalase, menghasilkan oksidase, menghasilkan asam

dari fermentasi glukosa, tidak menghasilkan indol dan mampu menghidrolisis pati, gelatin dan kasein (Yuniarti., *et al*, 2015). Hasil pengamatan sel isolat TG-50 disajikan pada gambar 4.



Gambar 4. Uji Biokimia sederhana a. Hasil Pewarnaan gram pada perbesaran 100x b. Hidrolisa pati positif c. Hidrolisa kasein positif d. Uji Katalase Positif

Conclusion

Hasil isolasi terhadap bakteri tanah di Tempat Pembuangan Akhir Sampah (TPAS) Talang Gulo menunjukkan bahwa 120 isolat berhasil diisolasi. 50 Isolat menunjukkan indikasi mampu menghasilkan protease. Isolat dengan kode TG-50 memiliki nilai indeks proteolitik tertinggi yaitu 3,00. Hasil karakterisasi dan uji biokimiawi terhadap isolat TG-50 menunjukkan bahwa isolat ini mengarah pada genus *Bacillus* dengan ciri

mikroskopis gram +, bentuk sel Rod (batang) dan positif pada uji hidrolisa Pati, Hidrolisa kasein dan uji katalase sedangkan pada uji selulosa negatif. Pada penelitian selanjutnya akan dilakukan optimasi lingkungan terhadap isolat TG-50 dalam memproduksi protease serta akan dilakukan pengujian enzim dalam membantu proses penyamakan kulit.

Acknowledgment (optional)

Penelitian ini merupakan penelitian Skema Penelitian Dosen Pemula yang didanai pada tahun 2020 oleh Kemenristek-Brin dengan nomor kontrak 086/SP2H/LT/DRPM/2020. Untuk itu pada kesempatan ini peneliti ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kemenristek-Brin atas bantuan dana yang diberikan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Tak lupa pula peneliti mengucapkan terimakasih kepada para pihak yang telah membantu dalam penyediaan sarana dan prasarana laboratorium yaitu kepada Kepala Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Adiwangsa Jambi dan Kepala Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Jambi. Dan semua pihak yang membantu peneliti dalam menyelesaikan penelitian ini.

References

- Abrar Hamza, T. (2017). Isolation and Screening of Protease Producing Bacteria from Local Environment for Detergent Additive. *American Journal of Life Sciences*, 5(5), 116. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20170505.11>
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., & Williams, S. (1994). *Bergey's manual of determinative microbiology*, 9th edn. *Lippincot, Williams and Wilkins, Baltimore*.
- Lestari, D. A., Muchlissin, S. I., Mukaromah, A. H., Darmawati, S., & Ethica, S. N. (2018). Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Staphylococcus Hominis Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi. *Seminar Nasional Edusainstek*.
- Melliawati R. 2015. *Isolasi bakteri Asam Laktat Sebagai Bakteri penghasil Enzim Protease*. Pros Sem nas Masy Biody Indo. 1.2.184-188
- Misgiyarta, M., Widowati, S. 2008. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenous. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*: 374-387
- Mokashe, N., Chaudhari, B., & Patil, U. (2017). Detergent-Compatible Robust Alkaline Protease from Newly Isolated Halotolerant *Salinicoccus* sp. UN-12. *Journal of Surfactants and Detergents*, 20(6), 1377–1393. <https://doi.org/10.1007/s11743-017-2024-y>
- Muchti Kurniawan, H., (2017). Isolasi dan optimasi ekstrinsik bakteri termo-proteolitik isolat sumber air panas semurup, kab. Kerinci, jambi *SCIENTIA JOURNAL* (Vol. 6).
- Sari, I. K., & Mukhsin, D. (2015). Penentuan Lokasi Terpilih Tempat Pembuangan Akhir Sampah di Kota Jambi. *Prosiding Perencanaan Wilayah Dan Kota*.
- Shah, I., Azam, N., Ud Din, G., Ali, N., Ullah, W., Qasim, M., ... Muhammad, N. (2014). Isolation and Characterization of Protease Producing Bacteria from Soil Samples of District Kohat, Pakistan. *Journal of Bio-Molecular Sciences*.
- Suberu Y, Akande I, Samuel T, Lawal A, Olaniran A. Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria using response surface

methodology. *Biocatal Agric Biotechnol*.2019.doi:10.1016/j.bcab.2019.01.049

Yuniarti, R., Nugroho, T. T., & Puspita, F. (2015). Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *Jom Fmipa*.

Yulvizar, C., 2015. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Indigenus dari Jruék Drien, Aceh. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia* 7(1):31-34