

**Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas  
Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Protease**

**Afif Nur Saidah (NIM. 10620045)**

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi,  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

**ABSTRAK**

Bakteri termofilik merupakan mikroba yang secara umum diartikan sebagai organisme yang hidup pada suhu diatas  $45^{\circ}\text{C}$ . Bakteri termofilik berpotensi sebagai sumber-sumber enzim khas yang dapat digunakan pada proses pengolahan limbah maupun pelapukan mineral. Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi biokatalis yang menyebabkan pemecahan protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri proteolitik termofilik yang terdapat di sumber air panas Pacet Mojokerto dengan melakukan isolasi dan identifikasi serta untuk mengetahui aktivitas enzim protease. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, uji aktivitas protease secara kualitatif dan kuantitatif serta identifikasi sampai tingkat spesies menggunakan Kit *Microbact*. Hasil isolasi diperoleh lima isolat bakteri proteolitik termofilik yang memiliki kemampuan proteolitik dengan menghasilkan zona bening pada substrat kasein. Berdasarkan ciri-ciri mikroskopis dan uji *Microbact*, diperoleh 5 isolat dan hanya 2 yang berbeda spesies yaitu isolat AP1, AP3, dan AP4 termasuk bakteri *Bacillus firmus*. Sedangkan isolat AP2 dan AP5 termasuk bakteri *Bacillus cereus*. Secara kualitatif, zona bening tertinggi dimiliki oleh isolat AP4 yaitu sebesar 25 mm. Sedangkan aktivitas enzim tertinggi dimiliki isolat AP5 yaitu sebesar 0,6910 U/mL.

**Kata Kunci:** Bakteri Termofilik, Enzim Protease, Zona Bening, Identifikasi, Uji Aktivitas Protease.

**PENDAHULUAN**

Bakteri termofilik merupakan mikroba yang secara umum diartikan sebagai organisme yang hidup pada suhu diatas  $45^{\circ}\text{C}$ . Organisme ini telah memberikan pengetahuan baru selama beberapa tahun terakhir. Minat para ilmuwan terhadap organisme termofil semakin tinggi terutama adanya

penemuan bakteri-bakteri yang dapat hidup pada suhu didih air atau bahkan lebih tinggi. Bakteri termofilik berpotensi sebagai sumber-sumber enzim khas yang dapat digunakan pada proses pengolahan limbah maupun pelapukan mineral (Brock, 1986)

Penggunaan enzim telah meningkat dan berkembang pesat

dalam bidang industri. Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri dan merupakan salah satu enzim yang dapat dihasilkan oleh bakteri termofilik. Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi biokatalis yang menyebabkan pemecahan protein (Suhartono, 1992). Penggunaan enzim protease sangat efektif dan menguntungkan. Dalam industri pangan, enzim protease dimanfaatkan untuk pengolahan susu, roti, biskuit, proses pematangan keju, pengempukan daging, dan pembuatan produk dari kedelai. Selain itu enzim protease juga digunakan pada beberapa aplikasi industri seperti deterjen, farmasi, produk-produk kulit, produk-produk makanan, dan proses pengolahan limbah industri (Kurniawati, 2012).

Protease dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti bakteri, jamur, tumbuhan dan hewan (Ohta dkk., 1966). Mikroorganisme adalah sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanamandan hewan. Pemilihan mikroorganisme sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan yang diisolasi dari tanaman ataupun hewan. Keuntungan tersebut antara lain sel mikroorganisme relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki produksi yang lebih besar, biaya produksinya relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim, dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek

(Kurniawati, 2012) serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim (Akhdiya, 2003). Protease bias diisolasi dari bagian ekstrasel dan intrasel. Bakteri penghasil protease, khususnya protease ekstraseluler banyak diproduksi oleh spesies *Bacillus* (Michael dkk., 1998).

Isolasi mengenai protease yang dihasilkan oleh bakteri termofilik masih terbatas di Indonesia. Padahal Indonesia memiliki banyak gunung berapi dan sumber air panas. Jika Indonesia yang memiliki banyak sumber air panas dapat mengembangkan penelitian ini, maka banyak keuntungan yang akan diperoleh. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan Untuk mengetahui jenis bakteri proteolitik termofilik yang terdapat di sumber air panas Pacet Mojokerto dengan melakukan isolasi dan identifikasi serta untuk mengetahui aktivitas enzim protease yang dihasilkan.

## METODE

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, mikroskopis, uji *Screening*, identifikasi dan uji aktivitas protease secara kuantitatif dari jenis bakteri termofilik penghasil protease yang diisolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto.

### A. Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik Termofilik

Sebanyak 10 ml sampel dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 90 ml media skim milk cair (pengenceran  $10^{-1}$ ), kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam

inkubator dengan suhu 50°C. Selanjutnya dibuat seri pengenceran  $10^{-2}$ - $10^{-10}$  dengan mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 ml aquadest steril. Sebanyak 1 ml dari tiap pengenceran dicawakan pada media *Skim Milk Agar* menggunakan metode *pour plate*. Media yang telah diinokulasi, diinkubasi pada suhu 50°C selama 48 jam dan diamati setiap 24 jam. Koloni yang dihasilkan dari isolasi diamati morfologinya dan koloni yang terpisah dipindahkan pada agar miring untuk pemurnian.

#### **B. Karakterisasi Bakteri Proteolitik Termofilik**

Isolat bakteri termofilik penghasil protease dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia yang mengacu pada buku *Bergey Manual of Determinative Bacteriology* 9<sup>th</sup>. Karakterisasi meliputi pengamatan makroskopik dan mikroskopik koloni

#### **C. Uji Bakteri Termofilik Proteolitik Secara Kualitatif**

Isolat bakteri termofilik dari media agar miring ditotolkan menggunakan jarum ose di pusat media SMA pada cawan petri. Media diinkubasi dalam inkubator pada suhu 50°C selama 48 jam. Adanya aktivitas protease secara kualitatif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Pengukuran diameter koloni dan diameter zona bening dilakukan menggunakan penggaris. Semakin besar zona bening yang terbentuk di sekitar koloni, maka semakin besar juga aktivitas protease yang dihasilkan

#### **D. Identifikasi Spesies Bakteri Menggunakan *Microbact***

Isolat bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 ml garam fisiologis 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen. Suspense bakteri yang telah homogen diteteskan kedalam sumur *Microbact* sebanyak 100 µl, untuk sumur Lysin, Omitin, dan H<sub>2</sub>S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan 2 tetes reagent Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.

Uji fermentasi karbohidrat pada *Microbact* 12B, tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil dari sumuran langsung bisa dibaca hasilnya, yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna tetap biru. Perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. (Oxoid, 2004).

#### **E. Pengujian Aktivitas Protease (Dina, 2012)**

Aktivitas enzim protease diukur dengan metode Bergmeyer dan Ward (1984) yang dimodifikasi. Metode ini menggunakan kasein

sebagai substrat. Substrat yang digunakan adalah kasein 1 % sebagai induser dilarutkan kedalam buffer posfat (50 mM, pH 7). 1 ml substrat kemudian direaksikan dengan 1 ml enzim selama 10 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml asam tricloro asetat (TCA) 10 % inkubasi selama 10 menit pada suhu 50°C. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Pada 1 ml supernatan ditambahkan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M dan pereaksi Folin Ciocalteau (1:2), campuran diinkubasi 20 menit pada suhu 50°C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Aktivitas protease ditentukan dengan cara menginterpolasikan nilai absorbansi dengan persamaan regresi dari kurva standar tirosin yang didapatkan. Blanko dibuat dengan cara yang sama, namun enzim di inaktifkan dahulu dengan direaksikan dengan 1 ml TCA. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 µmol tirosin per menit pada suhu dan pH optimum (Sugiyono dkk., 2008). Perhitungan aktifitas enzim protease dapat dihitung dengan rumus Walter (1984):

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

Dimana:

- [tirosin] :konsentrasi tirosin yang terbentuk
- v :volume total sampel pada tiap tabung (ml)
- q :waktu inkubasi (menit)
- p :jumlah enzim (ml)
- fp :faktor pengenceran

Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 µmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik

Hasil isolasi yang telah dilakukan diperoleh 5 isolat bakteri yang memiliki karakterisasi morfologi koloni yang berbeda satu sama lain, dan mampu tumbuh pada media SMA. Bakteri yang berhasil di isolasi ditumbuhkan dimedia seleksi yaitu SMA. Susu merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya akan nutrien.

Menurut Susanti (2002) susu skim mengandung kasein yang disertakan ke dalam medium pertumbuhan bakteri berfungsi sebagai substrat enzim. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease. Protease mengkatalisis degradasi kasein yaitu dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air ke dalam molekul.

### B. Karakterisasi Morfologi Koloni

Lima isolat yang dimurnikan pada media agar miring, selanjutnya ditumbuhkan pada media SMA dengan metode *streak kuadran* untuk dilakukan karakterisasi morfologi koloni. Dwidjoseputro (1989) menjelaskan bahwa karakteristik morfologi koloni bakteri pada suatu media yaitu bentuk koloni berupa bulat (circular), berbenang (filamentous),

tak teratur (irregular), serupa akar (rhizoid), dan serupa kumparan (spindel). Permukaan koloni berupa rata (flat), timbul datar (raised), melengkung (convex), dan membukit. Tepi koloni dapat berupa utuh (entire), berombak (undulate), berbelah (lobate), bergerigi (serrate), berbenang (filamentous), keriting (curcled), dan warna koloni bakteri berupa keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening. Pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan morfologi koloni bakteri secara makroskopis meliputi bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni dan warna koloni.

Hasil pengamatan morfologi koloni menunjukkan bahwa AP1 dan AP2 memiliki bentuk bulat, AP3 memiliki bentuk menyerupai benang, AP4 memiliki bentuk menyerupai titik-titik dan AP5 berbentuk tidak teratur. AP1, AP3, dan AP5 memiliki permukaan koloni timbul datar, AP2 memiliki permukaan koloni membukit dan AP4 memiliki permukaan koloni rata. Tepi koloni AP1, AP2, dan AP4 adalah utuh, sedangkan AP3 dan AP5 memiliki tepi koloni berombak atau bergerigi. Berdasarkan ciri-ciri makroskopis semua isolat koloninya berwarna krem. Isolat tunggal bakteri ditunjukkan anah panah pada Gambar 4.1.



**Gambar 4.1** Morfologi Koloni Bakteri Hasil Isolasi

### C. Uji Kemampuan Aktivitas Proteolitik Secara Kualitatif

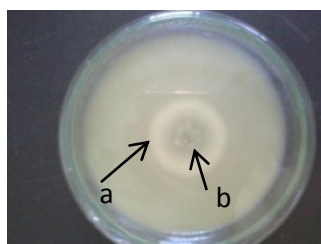
Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona jernih di sekitar koloni dengan besarnya diameter koloni (Widhyastuti & Dewi, 2001). Isolat-isolat bakteri yang diperoleh pada tahap isolasi, diuji secara kualitatif pada media seleksi. Uji kualitatif bertujuan untuk mengetahui bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik.

Hasil uji aktivitas proteolitik secara kualitatif dari 5 isolat yang mampu menghasilkan zona bening disekitar koloni yaitu AP1 memiliki nilai aktivitas kualitatif 9,6 mm, AP2 memiliki nilai aktivitas kualitatif 4 mm, AP3 memiliki nilai aktivitas kualitatif 14 mm, AP4 memiliki nilai aktivitas kualitatif 25 mm dan AP5 memiliki nilai aktivitas kualitatif 12 mm. Hasil hidrolisis lima isolat terhadap protein dalam media susu skim dapat dilihat pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1** Hasil Kemampuan Aktivitas Proteolitik Bakteri Termofilik Secara Kualitatif

| Kode Isolat | Diameter Zona Bening (mm) |
|-------------|---------------------------|
| AP1         | 9,6                       |
| AP2         | 4                         |
| AP3         | 14                        |
| AP4         | 25                        |
| AP5         | 12                        |





**Gambar 4.2** Kemampuan Aktivitas Proteolitik Bakteri Termofilik Secara Kualitatif  
**Keterangan:** a. Zona bening b. Koloni

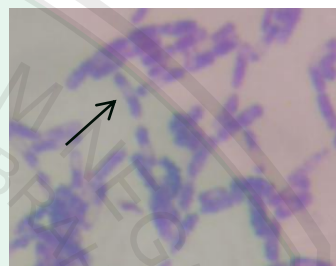
Besar aktivitas enzim proteolitik ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona bening, tetapi besarnya aktivitas enzim proteolitik yang berperan merombak protein dalam medium padat tidak dapat diketahui dan diukur secara kuantitatif. Hasil perombakan polimer protein hanya ditunjukkan dengan adanya zona bening yang menandakan protein telah dirombak menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam medium. Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona bening disekitar koloni dengan besarnya diameter koloni (Widhyastuti & Naiola, 2002).

#### D. Hasil Uji Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram

**Tabel 4.2** Hasil Uji Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Proteolitik Termofilik

| Kode Isolat | Pewarnaan Gram | Bentuk sel |
|-------------|----------------|------------|
| AP1         | +              | Basil      |
| AP2         | +              | Basil      |
| AP3         | +              | Basil      |
| AP4         | +              | Basil      |
| AP5         | +              | Basil      |

Berdasarkan hasil uji pewarnaan Gram yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri bersifat Gram positif yang ditandai dengan sel berwarna ungu. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa bentuk sel bakteri dari AP1 sampai AP5 berbentuk basil. Hasil uji pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3** Hasil Uji Pewarnaan Gram

Pengujian pewarnaan Gram dilakukan untuk menentukan karakter isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Lapisan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram positif lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif akan dihasilkan warna ungu, dengan tebal dinding sel bakteri Gram positif sebesar 20-80 nm sebagian besar tersusun dari peptidoglikan yang berakibat pada banyaknya kristal violet yang diserap oleh bakteri Gram positif lebih besar (Prescott dkk., 1999).

#### E. Identifikasi Isolat Bakteri Proteolitik Termofilik

Berdasarkan hasil karakterisasi dan uji biokimia menggunakan Kit *Microbact* terhadap 5 isolat yaitu isolat AP1, AP2, AP3, AP4, dan AP5 menunjukkan bahwa dari 5 isolat

tersebut hanya 2 spesies yang berbeda, yaitu isolat AP1, AP3, dan AP4 termasuk dalam spesies *Bacillus firmus*. Sedangkan isolat AP2 dan AP5 termasuk dalam spesies *Bacillus cereus*. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa kedua spesies bergenus *Bacillus*. Bentuk sel genus *Bacillus* batang lurus, berukuran antara 0,5-0,25 x 1,2-10  $\mu\text{m}$  dan kebanyakan hidup koloni atau berantai. Bersifat Gram positif dan endospora berbentuk oval atau kadang-kadang bulat atau silinder. Golongan bakteri ini bersifat aerob atau anaerob fakultatif, dan mempunyai kemampuan fisiologis terhadap suhu, pH, dan salinitas yang beragam. Biasanya katalase positif, dapat melakukan metabolisme fermentasi karbohidrat dan beberapa spesies bersifat patogen (Holt dkk., 1994).

### E.1 *Bacillus firmus*

*Bacillus firmus* bersifat Gram positif dan mempunyai endospora. Pada uji fermentasi gula-gula, bakteri *B. firmus* hanya mampu memfermentasi xylosa dan arabinosa. Sedangkan uji glukosa, mannitol, laktosa, sukrosa, dan maltosa hasilnya negatif. Selain itu dalam uji enzim, bakteri ini positif terhadap uji katalase dan oksidase. Pada uji *Voges Proskauer* (VP) hasilnya negatif, artinya bakteri ini tidak dapat memproduksi 2,3-butanediol sebagai hasil fermentasi dari glukosa (Cappuccino & Sherman 2005). Begitu juga pada uji indol hasilnya negatif. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri ini tidak dapat mendegradasi triptopan

yang merupakan asam amino esensial yang dapat mengalami oksidasi karena proses enzimatik oleh beberapa bakteri (Cappuccino & Sherman 2005). *B. firmus* dapat mereduksi nitrat, dapat menghidrolisis kasein dan pati serta bersifat motil dan sensitif terhadap penisilin. Nitrat merupakan senyawa yang cukup potensial untuk menggantikan peran oksigen sebagai akseptor hidrogen final selama pembentukan energi (Cappuccino & Sherman 2005). Menurut Rao (2007), *Bacillus firmus* MTCC 7728 penghasil enzim protease alkalin, pada uji *Methyl Red* (MR) positif, *Voges Proskauer* (VP) negatif, hidrolisis kasein positif, hidrolisis gelatin positif, hidrolisis pati positif, uji katalase positif, uji indol negatif, terdapat endospora, Gram positif dan bersifat motil serta dapat mereduksi nitrat.

### E.2 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* bersifat Gram positif dan mempunyai endospora. Pada uji fermentasi gula-gula, bakteri ini positif pada uji glukosa, laktosa, dan maltosa. Sedangkan pada uji xylosa, mannitol, sukrosa, dan arabinosa hasilnya negatif. Selain itu dalam uji enzim, bakteri ini positif terhadap uji katalase dan negatif pada uji oksidase. Pada uji VP (*Voges Proskauer*) hasilnya positif. Hasil isolasi dari tiram *Saccostrea cucullata* juga menemukan bakteri *Bacillus cereus* strain SU12 sebagai penghasil protease (Umayaparthi, 2013 ).

Uji MR (*Methyl Red*) hasilnya negatif, hal menunjukkan bahwa bakteri ini tidak dapat memproduksi asam organik hasil metabolisme glukosa. *Methyl red* ini digunakan untuk menentukan adanya fermentasi

asam campuran (Cappuccino & Sherman 2005). Begitu juga pada uji indol hasilnya negatif. Bakteri ini juga dapat mereduksi nitrat.

#### F. Uji Kemampuan Aktivitas Proteolitik Secara Kuantitatif

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum (Lehninger, 1993). Aktivitas enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia yaitu dengan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut, dan secara kuantitatif ditentukan dengan mengukur laju reaksinya. Aktivitas enzim protease yang dihasilkan secara kualitatif tidak selalu menjadi dasar yang baik untuk melihat aktivitas enzim-enzim proteolitiknya, sehingga perlu dilakukan uji lanjutan terhadap aktivitas protease secara kuantitatif. Hasil pengujian aktivitas protease dari lima isolat terpilih menunjukkan kelima isolat memiliki aktivitas protease secara kuantitatif yang berbeda. Hasil uji aktivitas protease disajikan pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3** Hasil Uji Aktivitas Enzim Protease

| No. | Kode Isolat              | Aktivitas (U/mL) |
|-----|--------------------------|------------------|
| 1.  | AP1 ( <i>B. firmus</i> ) | 0,4870           |
| 2.  | AP2 ( <i>B. cereus</i> ) | 0,4615           |
| 3.  | AP3 ( <i>B. firmus</i> ) | 0,3850           |
| 4.  | AP4 ( <i>B. firmus</i> ) | 0,4020           |
| 5.  | AP5 ( <i>B. cereus</i> ) | 0,6910           |

Tabel 4.6 menunjukkan bahwa dari kelima isolat, yang memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi yaitu isolat AP5 sebesar 0,6910 U/mL, dan yang memiliki aktivitas enzim terendah yaitu isolat AP3 sebesar 0,3850 U/mL.

Sedangkan secara kualitatif, zona bening tertinggi dimiliki oleh isolat AP4 yaitu sebesar 25 mm, dan zona bening terendah dimiliki oleh isolat AP2 yaitu sebesar 4 mm. Besarnya aktivitas enzim protease menunjukkan bahwa bakteri dapat menghasilkan enzim protease yang mampu mendegradasi kasein menjadi asam amino dan peptida.

Berdasarkan data hasil uji aktivitas protease secara kualitatif dan hasil uji aktivitas protease secara kuantitatif tidak terdapat korelasi. Beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab tidak terkorelasinya aktivitas tersebut yaitu pada uji aktivitas protease secara kualitatif besarnya zona bening diukur menggunakan penggaris dan pengamatan dilakukan secara visual. Sedangkan pada uji aktivitas secara kuantitatif diukur menggunakan alat-alat laboratorium dan perlakuannya lebih intensif. Ward (1985) mengindikasikan bahwa tidak selalu terdapat korelasi yang baik antara zona bening protein disekitar koloni pada media padat dengan kemampuan organisme tersebut. Sian (1992) mengukur aktivitas protease *Bacillus licheniformis* hasilnya hanya mampu menghasilkan zona bening yang kecil, namun mempunyai kemampuan yang besar dalam menghasilkan protease. Isolat SP2 dengan hidrolisis tertinggi secara kualitatif sebesar 5,96 mm hanya menghasilkan aktivitas enzim secara kuantitatif sebesar 9,93 Unit, sedangkan SP3 dengan aktivitas hidrolisis secara kualitatif terendah sebesar 5,22 mm, memperlihatkan aktivitas yang lebih tinggi dari SP2 (Pakpahan, 2009).



Adanya aktivitas enzim yang berbeda nilainya setiap isolat kemungkinan disebabkan oleh setiap jenis mikroorganisme menghasilkan enzim yang berbeda jumlah dan urutan asam amino pembentuk enzim tersebut. Menurut Agustien (2010), bahwa aktivitas spesifik enzim yang berbeda dari isolat *Bacillus* spp. kemungkinan disebabkan jumlah enzim dan asam amino protein enzim yang dihasilkan masing-masing isolat *Bacillus* spp. berbeda satu sama lain.

### KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri proteolitik termofilik dari sumber air panas Pacet Mojokerto diperoleh 5 isolat dan 2 yang berbeda spesies yaitu isolat AP1, AP3, dan AP4 termasuk bakteri *Bacillus firmus*. Sedangkan isolat AP2 dan AP5 termasuk bakteri *Bacillus cereus*. Hasil uji aktivitas enzim protease termofilik dari 5 isolat yaitu AP1 sebesar 0,4870 U/mL, AP2 sebesar 0,4615 U/mL, AP3 sebesar 0,3850 U/mL, AP4 sebesar 0,4020 U/mL dan AP5 sebesar 0,6910 U/mL.

### SARAN

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan menambah variabel yang diamati diantaranya variasi suhu dan pH pada bakteri *Bacillus firmus* dan *Bacillus cereus* untuk mengetahui optimasi aktivitas enzim protease yang dihasilkan bakteri termofilik dan perlu dilakukan pemurnian enzim secara parsial untuk menghasilkan aktivitas enzim yang lebih besar.

### DAFTAR PUSTAKA

Agustien, N. 2010. *Hubungan Antara Asupan Protein dengan*

*Kekurangan Energi Kronik (KEK) Pada Ibu Hamil di Kecamatan JebresSurakarta*. Surakarta: USM.

Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah*. Vol. 9 (2): 38-44

Brock TD. 1986. *An overview of the thermophiles. dalam Brock TD. Thermophiles: General Molecular and Applied Microbiology*. New York: J Wiley.

Cappuccino, J.G. and Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual*. California: The Benjamin Comings Publishing Company, Inc.

Dwidjoseputro, D. 1989. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Kurniawati, Heny Dwi. 2012. *Seleksi, Karakterisasi, Dan Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi Sebagai Penghasil Enzim Protease*. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta

Lehninger, A.I. 1993. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga

Michael, H., Cardone., Natalie R., Henning R., Stennicke., Guy, S., Salvesen., Thomas, F. F., Eric S., Steven F., and John C. R. 1998. *Regulation cell death*. Reports. Science. 282.

- Ohta, Y., Ogura Y., & Wada A. 1966. Thermostable protease from thermophilic bacterial, I. Thermostability, physical properties, and amino acids composition. *Journal of Biological Chemistry*. 241: 5919-5925.
- Oxoid. 2004. Gram negative identification system. <http://www.oxoid.com/uk/index.asp?mpage=productdetail&pre> [21 Februari 2014].
- Pakpahan, Rosliana. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara. *Tesis*. Medan: USU *Pascasarjana*. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. 1999. *Microbiology Fourth Edition*. New York: Mc Graw Hill
- Rao, Kiranmayee and M. Lakshmi Narasu. 2007. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 (21), pp. 2493-2496. Diakses tanggal 10 November 2014
- Sian LW. 1992. Mempelajari aktivitas protease *Bacillus licheniformis* galur Gibson NCTC 10341 pada fermentasi terkontrol menggunakan limbah cair tahu [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Suhartono MT. 1992. *Protease*. Bogor: IPB Pr.
- Susanti, E. 2002. Isolasi dan karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Biodiversitas*. 4 : 12 – 17.
- Umayaparthi S. dkk,. 2013. Purification and characterization of protease from *Bacillus cereus* SU12 isolated from oyster *Saccostrea cucullata*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12 (40), pp. 5897-5908, 2 October, 2013. ISSN 1684-5315 ©2013 Academic Journals [10 November 2014]
- Walter, H.E. 1984. *Method With Haemoglobin, Casein, And Azocoll As Substrate In. Bergmeyer*. HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie. Deerfield Beach Florida Basel.
- Ward OP. 1985. *Proteinase*. In Fogarty WM (ed). *Microbial and enzyme biotechnology*. New York: Appl. Science Publ. 251-290
- Widhyastuti N & Dewi RM. 2001. Isolasi bakteri proteolitik dan optimasi produksi protease. *Laporan Teknik Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya Hayati*. Pusat penelitian Biologi. LIPI.
- Widhyastuti N, Naiola E. 2002. Isolasi, seleksi, dan optimasi produksi protease dari beberapa isolat bakteri. *Berita Biologi* 6:467-473.
- Yusriah dan Nengah Dwianita Kuswytasari. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni POMITS*. Volume 2. Nomor 1.