

## BAB II

### KAJIAN PUSTAKA

#### 2.1 Bakteri Termofilik

Salah satu jenis mikroorganisme yang banyak dieksplorasi adalah mikroorganisme termofilik yang hidup di daerah sekitar gunung berapi dan sumber air panas. Mikroorganisme yang dapat hidup pada suhu termofilik hanyalah prokariot dari kelompok Arkaea dan Bakteri (Madigan dan Mairs, 1997).

Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam kehidupan mikroba. Beberapa mikroba dapat tumbuh pada kisaran suhu yang luas. Berkait dengan suhu pertumbuhan dikenal suhu minimum, optimum dan maksimum. Suhu minimum adalah suhu yang paling rendah dimana kegiatan mikroba masih berlangsung. Suhu optimum adalah suhu yang paling baik untuk kehidupan jasad. Sedangkan suhu maksimum adalah suhu tertinggi yang masih dapat menumbuhkan mikroba tetapi pada tingkat kegiatan fisiologis yang paling rendah (Hidayat, 2006).

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhan, mikroorganisme secara umum dibedakan atas mikroorganisme psikrofil, mesofil, termofil, dan hipertermofil. Bakteri psikrofil hidup pada kisaran suhu 0-20°C, bakteri mesofil dapat tumbuh pada suhu 20-45°C dan bakteri termofil tumbuh pada suhu 45-65°C. Bakteri hipertermofil hidup pada suhu di atas 90°C dan maksimal pada suhu 100°C, namun pada beberapa bakteri dapat hidup pada suhu 80-113°C (Prescott, 2005).

Indonesia sebagai negara tropis mempunyai banyak daerah dengan aktivitas geotermal, seperti daerah pegunungan berapi, sumber air panas dan cadangan minyak bumi dan batubara. Beberapa kondisi lingkungan yang berbeda dalam setiap lokasi memungkinkan adanya heterogenitas bakteri termofil yang tinggi (Indrajaya dkk., 2003). Bakteri termofil menghasilkan enzim termostabil yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi, seperti dalam teknik-teknik biologi molekuler untuk kegunaan penelitian dan diagnostik (enzim yang memproses DNA dan RNA) dan kemampuan enzim untuk mengubah tepung, makanan, pengelolaan sampah, pembuatan kertas dan sintesis zat-zat organik (Vielle dan Zeikus dalam Sutiamiharja, 2008).

Bakteri termofilik pertama kali diisolasi pada tahun 1879 oleh Miquel, yang mampu berkembang biak pada suhu 72°C. Bakteri termofilik juga berhasil diisolasi dari kawah air panas dan sedimen lautan geotermal (Edwards, 1990). Spesies termofilik umumnya banyak ditemukan pada lingkungan yang ekstrim, misalnya daerah vulkanik dan sumber air panas. Bakteri ini umumnya berasal dari genus *Beggiatoa*, *Thermochromatium*, *Acidithiobacillus*, *Thermithiobacillus*, *Thermomonas*, *Methylococcus*, *Pyrococcus* dan *Alterococcus* (Labeda, 1990).

Mikroorganisme termofil telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia. Karina (2010), telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Vibrio* sp. dari sumber air panas Songgoriti. Helin (2010), berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri termofilik dari sumber air Gedong Songo dengan metode analisis gen 16S rRNA, hasil penelitian menunjukkan

bahwa terdapat kesamaan yang ditunjukkan oleh bakteri *Geobacillus thermoleovorans* yang dapat tumbuh pada kisaran suhu antara 65°C sampai 75°C. Brock (1978), menemukan bakteri *Thermus aquaticus*, suatu bakteri yang mampu tumbuh di atas suhu 70°C. Bakteri ini menghasilkan enzim termostabil. *Bacillus* umumnya merupakan mikroorganisme yang dominan dalam suatu lingkungan. Pada lingkungan yang kurang cocok, bakteri ini membentuk endospora, sementara bakteri lain yang tidak memiliki endospora menuntut kondisi yang spesifik untuk dapat bertahan hidup (Sutiamiharja, 2008).

Kemampuan bakteri termofil yang mampu hidup pada temperatur tinggi merupakan salah satu kebesaran-Nya yang patut disyukuri. Hal ini merupakan salah satu kelebihan bakteri yang diberikan Allah *Subhanahu wa Ta'ala* untuk dapat mempertahankan hidupnya dan dapat bermanfaat bagi manusia sebagai penghasil enzim. Hanya Dia yang kuasa menciptakan segala sesuatu menurut kehendak-Nya dan patut di puji. Sebagaimana Firman-Nya dalam Q.S At-Taghabun [64] ayat 1 sebagai berikut:

يُسَبِّحُ لِلَّهِ مَا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ لَهُ الْمُلْكُ وَلَهُ الْحَمْدُ وَهُوَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ ﴿١﴾

Artinya: “Bertasbih kepada Allah apa yang ada di langit dan apa yang ada di bumi; hanya Allah lah yang mempunyai semua kerajaan dan semua pujian, dan Dia Maha Kuasa atas segala sesuatu” (Q.S At-Taghabun [64]:1).

‘Aidh al-Qarni dalam tafsirnya *Muyassar* (2007) menjelaskan bahwa segala sesuatu yang ada di langit dan di bumi menyucikan Allah dari segala sifat yang tidak layak Dia sandang, menyucikan-Nya dari segala aib dan kekurangan, dan

memuliakan-Nya dengan pujian-pujian kepada-Nya. Allah *Subhanahu wa Ta'ala* adalah satu-satunya yang berhak dalam mencipta, mengatur, dan menakdirkan. Dia-lah yang berhak mendapatkan pujian yang baik karena Dia sangat terpuji dan mulia. Dia-lah yang tidak ada suatu pun yang sulit bagi-Nya. Dia-lah yang tidak bisa ditandingi oleh apa pun. Kekuasaan-Nya pasti terlaksana dan kehendak-Nya pasti terjadi.

Menurut Brock (1986), terdapat tiga faktor yang menyebabkan bakteri termofilik mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada suhu tinggi, yaitu kandungan enzim dan protein yang lebih stabil dan tahan terhadap panas, molekul pensintesis protein yang stabil terhadap panas, dan membran lipid sel termofil mengandung banyak asam lemak jenuh yang membentuk ikatan hidrofobik yang sangat kuat. Bakteri termofilik, contohnya *Thermus aquaticus* memiliki membran termostabil yang akan memproduksi lemak yang memiliki titik cair yang lebih tinggi ketika temperatur lingkungan naik. Bakteri termofilik mampu mensintesis molekul stabil, seperti enzim yang mampu mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia pada suhu tinggi dan lebih stabil dibandingkan enzim yang dihasilkan bakteri mesofilik.

Keanekaragaman bakteri termofilik memberikan gambaran potensi yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Pada saat ini bakteri termofilik dipelajari dan diteliti secara intensif karena alasan pengembangan penelitian dasar dan aplikasi bioteknologi. Bakteri termofilik berpotensi sebagai sumber-sumber enzim khas yang dapat digunakan pada proses pengolahan limbah maupun pelapukan mineral (Brock, 1986). Enzim-enzim tersebut mampu bertahan dan aktif pada temperatur yang tinggi.

Sifat seperti ini sangat dibutuhkan oleh industri-industri berbasis enzim. Penggunaan enzim yang mampu bertahan pada suhu tinggi dalam bidang bioteknologi dapat menurunkan biaya operasional dan meningkatkan kecepatan reaksi (Aguilar dkk., 1998).

## 2.2 Protease

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Enzim bekerja dengan urutan yang teratur. Enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien. Enzim juga mengkatalisis reaksi penyimpanan energi kimiawi dan membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana (Lehninger, 1982). Organisme hidup yang berperan sebagai sumber enzim meliputi tanaman, hewan, dan mikroba. Salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroba adalah protease. Protease merupakan salah satu enzim yang resisten terhadap panas. Berbagai jenis bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, dan *Serratia* merupakan penghasil enzim protease yang cukup potensial (Suhartono, 1989). Protease juga dihasilkan oleh sejenis kapang, seperti *Aspergillus oryzae*, *Penicillium*, *Aspergillus niger*, dan *Mucor miehei* (Ramadzanti, 2006).

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi biokatalis yang menyebabkan pemecahan protein. Protease menghidrolisis protein menjadi polipeptida dan asam amino. Menurut Komisi Tatanama *Internasional Union of Biochemist and Molecular Biologist*, protease termasuk ke dalam kelompok hidrolase pemecah protein (kelompok ke III subkelompok IV). Kerja enzim ini membutuhkan

air, sehingga dimasukkan dalam kelas hidrolase (Ward, 1983). Protease sering disebut enzim proteolitik karena dapat merusak protein (Janzen dkk., 1982). Protease terdiri atas proteinase dan peptidase. Proteinase mengkatalisis reaksi hidrolisis molekul protein menjadi fragmen besar polipeptida. Peptidase menghidrolisis fragmen besar polipeptida menjadi asam amino (Winarno, 1985).

Protease dapat dihasilkan secara intraseluler dan ekstraseluler oleh hewan, tanaman, dan mikroba yang berperan penting dalam metabolisme dan regulasi sel. Protease ekstraseluler diperlukan makhluk hidup untuk menghidrolisis nutrisi protein menjadi peptida kecil dan asam amino, sehingga dapat diserap dan dimanfaatkan oleh sel tubuhnya. Protease intraseluler bertanggung jawab terhadap degradasi proteolitik secara cepat dan irreversible bagi protein sel yang fungsinya tidak diperlukan lagi atau protein abnormal yang tidak bermanfaat bahkan mengganggu metabolisme sel (Suhartono, 1992).

### **2.2.1 Klasifikasi Protease**

Secara garis besar protease dibagi menjadi dua kelompok, yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase akan memotong ikatan peptida yang berada pada bagian tengah rantai polipeptida, sedangkan eksopeptidase memotong di ujung rantai polipeptida baik berupa ujung karboksil maupun ujung asam amino. Penggolongan protease lainnya adalah berdasarkan data deret asam amino enzim yang mengarah kepada hubungan evolusi dan struktur enzim. Klasifikasi ini sangat penting, mengingat kemiripan struktur enzim di dalam keluarga yang sama, biasanya mencerminkan kemiripan dalam hal mekanisme katalitik (Irena, 2010). Menurut Rao

dkk. (1998), berdasarkan pH kerjanya protease dapat dikelompokkan menjadi tiga bagian, yaitu protease asam, netral, dan alkali. Kelompok protease asam terdiri atas protease aspartat dan beberapa protease sistein yang memiliki pH optimum antara dua sampai enam. Protease netral aktif pada kisaran pH netral. Protease alkali ditemukan aktif pada pH antara delapan dan tiga belas.

Ward (1983), mengklasifikasikan protease berdasarkan sifat-sifat kimia sisi aktif enzim, yaitu protease serin (memiliki asam amino serin pada sisi aktifnya), protease sulfhidril (memiliki gugus sulfhidril pada sisi aktifnya), protease metal (memiliki ion logam pada sisi aktifnya), dan protease asam (memiliki dua gugus karboksil pada sisi aktifnya). Menurut Sadikin (2002), berdasarkan mekanisme katalitiknya protease dapat dibagi menjadi empat, yaitu protease serin, protease sistein, protease aspartat, dan protease logam.

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease (protease serin, protease sistein/tiol, protease aspartat dan protease logam) adalah enzim yang banyak digunakan dalam industri, misalnya industri farmasi, kulit, deterjen, makanan dan pengolahan limbah (Pastor dkk, 2001; Ward, 1985). Protease yang digunakan di dalam industri jumlahnya sekitar 60% dari penjualan enzim di dunia (Singh dkk., 2001; Zeikus dkk., 1998).

### 2.2.2 Protease Termofilik

Kebanyakan protease stabil pada suhu normal (mesofilik), namun enzim mesofilik sering tidak secara optimal beradaptasi dengan kondisi-kondisi dimana enzim diharapkan dapat diterapkan. Karena alasan ini beberapa strategi digunakan untuk meningkatkan karakteristik dari biokatalisator seperti stabilitas, aktivitas, spesifitas, dan pH optimum. Isolasi enzim dari organisme yang mampu bertahan di bawah kondisi-kondisi ekstrim, dapat menjadi sumber penting untuk biokatalis baru (Fujiwara dkk., 1993). Akhir-akhir ini, protease dari mikroorganisme termofilik menjadi pusat perhatian terutama pada enzim-enzimnya. Selama evolusinya mikroorganisme ini beradaptasi untuk tumbuh dalam cakupan luas pada suhu, pH dan tekanan (Setter, 1996).

Protease bakteri termostabil menjadi pusat perhatian karena stabilitasnya pada suhu yang lebih tinggi. Enzim termofilik secara optimal aktif jauh di bawah kondisi terdenaturasi (Gupta dkk., 2002). Istilah termostabil dapat didefinisikan dalam sejumlah arti dan bersifat relatif. Definisi termostabil umumnya dihubungkan dengan sifat alami dari enzim dan sumber penghasil enzim. Enzim termostabil sering dikenal dengan sebutan termozim merupakan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik. Enzim ini tidak mengalami denaturasi akibat naiknya suhu lingkungan dan menunjukkan aktivitas optimum pada suhu tinggi (6-120°C) (Wiryawan, 2011).

Enzim termostabil biasanya digunakan untuk meneliti beberapa hal, seperti evolusi enzim, mekanisme molekuler, termostabil protein dan batas suhu maksimum. Enzim termostabil secara struktur maupun fungsi memiliki keunikan tersendiri,

berbeda dengan enzim yang berasal dari bakteri mesofilik. Hal ini diakibatkan karena enzim ini menunjukkan ketahanan terhadap suhu tinggi yang sangat baik. Enzim termostabil memiliki mekanisme katalitik yang sama dengan enzim mesofilik. Namun, sifat ketahanannya terhadap suhu menyebabkan enzim termostabil memiliki nilai komersial yang sangat besar. Penggunaannya dalam bidang industri umumnya digunakan dalam industri tekstil, farmasi dan industri makanan. Enzim termostabil memiliki beberapa nilai ekonomis, diantaranya adalah (Wiryawan, 2011):

1. Stabil selama penyimpanan yang akan mengurangi biaya produksi
2. Reaksi berlangsung pada suhu tinggi sehingga akan mengurangi kontaminasi oleh bakteri mesofilik
3. Lebih tahan terhadap pelarut, deterjen, dan senyawa denaturan
4. Pada suhu tinggi proses fermentasi akan lebih cepat karena reaksi enzim akan meningkat sampai pada rentangan suhu tertentu.
5. Pemisahan produk yang mudah menguap akan lebih cepat

Pemakaian enzim termostabil disamping tahan terhadap denaturasi panas, juga dapat meminimalkan risiko kontaminan dan dapat menggeser reaksi kearah pembentukan produk. Penggunaan enzim termostabil dalam bioteknologi telah dapat menurunkan biaya operasional, disamping dapat meningkatkan kecepatan reaksi-reaksi biokimianya (Wiryawan, 2011).

Mikroorganisme termofilik dapat diisolasi dari berbagai sumber, termasuk sumber air panas baik terdapat di darat maupun di laut, tanah yang selalu terkena sinar matahari, bahan yang mengalami fermentasi seperti kompos dan instalasi air

panas. Bakteri termofilik merupakan bakteri dengan kemampuan bertahan hidup pada kondisi panas sampai ekstrim panas, pada beberapa literatur bahkan disebutkan ada yang mampu bertahan hidup pada suhu 250°C (Vieille & Zeikus, 2001).

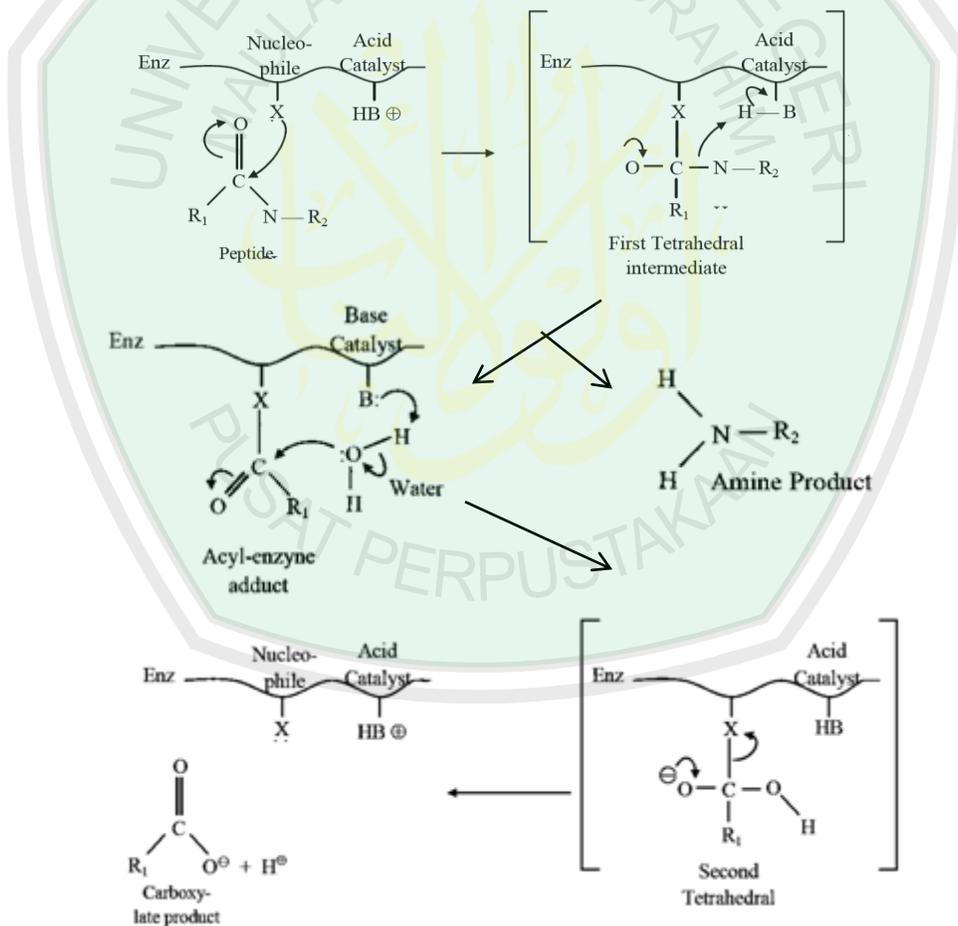
Sintesis protein pada suhu tinggi tidak hanya membutuhkan enzim termostabil, tetapi juga membutuhkan asam inti yang termostabil, yaitu mRNA, tRNA dan rRNA. Perubahan kimia walaupun sedikit, akan berakibat terhadap perubahan fisik dari tRNA yang sifatnya menjadi lebih stabil. Organisme termofil memiliki kecenderungan mempunyai kandungan G(guanin)+C(citosin) yang tinggi. Semakin tinggi nilai G+C maka semakin sukar molekul untai DNA dipisahkan. Adanya ion  $Mg^{2+}$  yang melindungi denaturasi akibat panas dan terjadinya tiolasi dari ribotimidin menjadi 5-metil-2-tiouridin menyebabkan enzim stabil pada suhu tinggi (Sundaram *dalam* Brock, 1986).

### **2.3 Hidrolisis Protein Oleh Enzim Protease**

Dalam sel eukariotik, degradasi protein terjadi dalam dua tahap. Pertama adalah protein mengalami modifikasi oksidatif untuk menghilangkan aktivitas enzimatik. Dan kedua adalah penyerangan protease yaitu enzim yang berfungsi untuk mengkatalis degradasi protein (Toha, 2001).

Bobot molekul (BM) protein berkisar antara 5000 sampai lebih dari 1.000.000. Karena itulah ia tergolong suatu makromolekul. Untuk mengetahui komponen senyawa kimia dari makromolekul protein, perlu menghidrolisis suatu makromolekul protein. Komponen senyawa kimia protein ialah peptida (sebagai sub

makromolekul), asam amino (sebagai unit molekul), dan C, H, O, N, S, P, Fe, Cu, Zn, dan I (sebagai komponen unsur kimia). Hasil hidrolisis dari semua macam protein yang ada di alam ini selalu menghasilkan dua puluh asam amino, sedangkan di alam ini sudah ditemukan lebih dari 150 asam amino. Ternyata, asam amino yang dapat membentuk molekul protein hanya dua puluh asam amino, selebihnya terdapat bebas di alam (Hawab, 2004). Reaksi hidrolisis enzimatik ikatan peptida secara umum ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Moran dkk., 1994):



**Gambar 2.1.** Mekanisme Umum Hidrolisis Enzimatik Ikatan Peptida (Moran dkk., 1994 dalam Rosliana, 2009: 23)

Hidrolisis ikatan peptida adalah reaksi penambahan-penghilangan, dimana protease bertindak sebagai nukleofili atau bereaksi dengan membentuk satu molekul air (Bauer dkk., 1996). Secara umum nukleofili membentuk intermediat tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif, yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air. Pada protease tertentu, adisi enzim-asil dapat dibentuk, seperti pada Gambar 2.1 intermediat tetrahedral kedua akhirnya dibentuk dan menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang diregenerasi (Moran dkk., 1994).

Katabolisme protein makanan pertama kali berlangsung di dalam lambung. Di tempat ini protease khas (pepsin) mendegradasi protein dengan memutuskan ikatan peptida yang ada di sisi  $\text{NH}_2$  bebas dari asam amino aromatik, hidrofobik, atau dikarboksilat. Kemudian di dalam usus, protein di degradasi oleh protease khas seperti tripsin, kimotripsin, karboksipeptidase dan elastase. Hasil pemecahan ini adalah bagian-bagian kecil polipeptida. Selanjutnya senyawa ini dipecah kembali oleh aktivitas aminopeptidase menjadi asam-asam amino bebas. Produk ini kemudian melalui dinding usus halus masuk ke dalam aliran darah menuju ke berbagai organ ternasuk ke dalam sel (Toha, 2001).

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua bakteri mempunyai enzim protease ekstraseluler (Fardiaz, 1992).

Protease ekstraseluler lebih dikenal dengan nama enzim proteolitik atau protease yang merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida-peptida kecil dan asam amino. Oleh karena yang dipecah adalah rantai peptida, maka enzim tersebut dinamakan juga peptidase. Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim peptidase dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase (Mubarik dkk., 2000).

Pepsin, kimotripsin, tripsin termasuk golongan enzim protease endopeptidase. Golongan enzim ini menyerang protein dari tengah molekul dan sering juga disebut sebagai enzim proteinase karena menyerang polipeptida tinggi atau protein. Tripsin menyerang ikatan lisil dan ikatan arginil sehingga peptida yang dihasilkan mempunyai ujung lisin atau arginin pada terminal karboksil. Pepsin bersifat kurang khas namun lebih mengutamakan serangan pada titik asam amino aromatik atau asam amino asam. Hasil degradasi golongan enzim endopeptidase ini adalah oligopeptida atau fragmen kecil protein (Toha, 2001).

Enzim karboksipeptidase dan aminopeptidase merupakan golongan enzim protease eksopeptidase yang menyerang ujung dan pangkal oligopeptida atau fragmen kecil protein. Golongan enzim ini hanya membebaskan asam-asam amino pada ujung oligopeptida (Toha, 2001). Karboksipeptidase dapat melepaskan asam amino yang memiliki gugus  $-COOH$  bebas pada ujung molekul protein sedangkan aminopeptidase dapat melepaskan asam amino pada ujung lainnya yang memiliki gugus  $-NH_2$  bebas (Poedjadi, 1994). Degradasi golongan enzim ini menghasilkan berbagai asam amino penyusun protein (Toha, 2001).

## 2.4 Mikroba Termofil Penghasil Protease

Konsep tentang termostabilitas yang dimiliki oleh enzim yang berasal dari mikroorganisma termofil ini dilandaskan pada dua konsep yaitu pertama struktur molekular pada selnya yang memang tersusun oleh molekul protein yang termostabil, kedua termostabilitas itu berkaitan dengan adanya asosiasi senyawa protein enzim dengan molekul lainnya seperti lipid, polisakarida maupun protein lainnya yang menyebabkan terbentuknya suatu senyawa yang memiliki mekanisme yang memungkinkannya tetap stabil saat menghadapi kondisi yang dapat menginaktivasinya (Hibino dalam Dessy, 2008).

Salah satu bakteri yang diduga banyak sebagai penghasil enzim protease adalah genus *Bacillus*. Beberapa bakteri termofil penghasil enzim protease yang telah diisolasi dan dikarakterisasi antara lain *Bacillus thermoproteolyticus*, *Bacillus caldolyticus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldovelox* DSM 411, dan *Bacillus subtilis* (Sugiyono, 2008). Banyak industri menggunakan protease dalam deterjen, peragian, pengembang, penyamakan kulit dan pengempukan daging berasal dari *Bacillus*, *Aspergillus oryzae* dan *Streptomyces* spp. Tipe protease ini umumnya dihasilkan selama proses fermentasi dan dikeluarkan ke dalam media produksi (Headon dan Walsh, 1994).

Bakteri termofilik telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia. Isolasi dari sumber air panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara diperoleh 3 isolat dengan zona bening terbesar yaitu SP1 dengan nilai aktivitas kualitatif 5,81 mm yang diperoleh dari kolam III (suhu 59°C, pH 6,5-7), SP2 dengan

nilai aktivitas kualitatif 5,96 mm yang diperoleh dari kolam II (suhu 65°C, pH 6,5-7) dan SP3 dengan nilai aktivitas kualitatif 5,22 mm yang diperoleh dari kolam I (suhu 66°C, pH 6,5-7) (Pakpahan, 2009). Hasil isolasi dan identifikasi bakteri termofilik penghasil protease dari sumber air panas Tanjung Sakti Lahat Sumatera Selatan, diperoleh 4 isolat yang mampu menghasilkan protease dengan indeks proteolitik tertinggi sebesar 0,77 mm dihasilkan oleh isolat TA4 dan hasil identifikasi isolat tersebut tergolong dalam genus *Saccharococcus* (Muharni, 2013).

Hasil isolasi dan optimasi protease bakteri termofilik dari sumber air panas Tangkuban Perahu Bandung menunjukkan bahwa dari 11 isolat yang telah di uji aktivitas proteoliticnya, diperoleh indeks proteolitik terbesar yaitu 33,5 mm yang dimiliki isolat T8. Aktivitas tertinggi bakteri T8 ditunjukkan pada sampel yang diambil pada jam ke-21 sebesar  $3.8375 \times 10^{-3}$ U/mL. Aktivitas protease meningkat dengan pengendapan amonium sulfat 60%, yaitu  $7.7257 \times 10^{-3}$ U/mL. Hasil analisis secara statistik dengan program SAS yang dilanjutkan dengan uji *Duncan* menunjukkan bahwa pH dan suhu memberikan pengaruh terhadap aktivitas protease. Aktivitas protease tertinggi pada pH 8 bufer Clark & Lubs dan suhu 60°C (Irena, 2010).

Hasil isolasi dari sumber air panas Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi diperoleh bakteri termofilik yang menghasilkan protease sebanyak 39 isolat. Isolat bakteri yang memiliki indeks proteolitik tertinggi adalah MII<sub>2.1</sub> yaitu 7,89 mm. Dan nilai uji aktivitas enzim protease tertinggi terdapat pada isolat MI<sub>2.3</sub> yaitu sebesar 13,592 U/ml. Karakter dari isolat bakteri MI<sub>2.3</sub> bersifat gram positif, sel berbentuk

batang, bersifat non motil. Suhu pertumbuhan optimum 50°C dan pH optimum 9,0. Isolat MI<sub>2.3</sub> ini positif pada uji amilase dan katalase namun negatif pada uji selulase dan lipase (Dina, 2012). Salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroba adalah protease. Protease merupakan salah satu enzim yang resisten terhadap panas. Berbagai jenis bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, dan *Serratia* merupakan penghasil enzim protease yang cukup potensial (Suhartono, 1989).

## 2.5 Aplikasi Protease Termofilik

Teknologi enzim dipandang sebagai teknologi yang diduga akan menjadi teknologi yang paling ideal untuk masa yang akan datang sebab enzim hanyalah berupa protein dan tidak bersifat toksik dan dapat mengalami denaturasi secara alami sehingga tidak menimbulkan bahaya apapun terhadap lingkungan. Sebagai tambahan bahwa enzim mampu mengkatalisis suatu reaksi biokimia secara efektif, efisien dan spesifik dan bahkan dengan kemajuan teknik imobilisasi, enzim dapat dipergunakan secara berulang kali tanpa mengurangi laju reaksi biokimia yang dikatalisisnya (Darwis dan Sukara, 1990).

Termofil saat ini menjadi tujuan sumber-sumber enzim termostabil yang relevan dengan industri yang beroperasi pada suhu tinggi. Aktivitas mikroorganisme ini serta enzim yang dihasilkan dapat dimanfaatkan untuk konversi biomassa ke produk target (Karlson dkk., 2007). Kebanyakan protein-protein industri yang

ditemukan bersumber dari mikroba, khususnya protease mikroba mencapai 40% dari total jumlah enzim yang di jual di seluruh dunia (Gupta dkk., 2002).

Dalam industri pangan protease digunakan pada pembuatan roti, biskuit, keju, bir, dan alkohol. Penambahan protease pada adonan roti dimaksudkan untuk mengubah elastisitas serta tekstur dari gluten, sehingga volume roti dapat ditingkatkan. Dalam pembuatan biskuit, protease digunakan untuk menghasilkan adonan dengan ekstensibilitas dan kekuatan yang seimbang, sehingga adonan dapat dibentangkan dengan tipis. Dalam industri bir, protease berfungsi sebagai penjernih. Pada industri alkohol, enzim ini digunakan untuk menghidrolisis protein yang menyelubungi pati, sehingga mudah dipecah menjadi alkohol oleh khamir. Dalam industri pangan lainnya, protease digunakan untuk mengempukkan daging, pembuatan kecap dari kedelai, dan menghidrolisis protein pada ikan untuk menghasilkan minyak ikan (Suhartono, 1989).

Enzim protease yang banyak dicari oleh kalangan industri adalah yang berkualitas tinggi, terutama tahan dan stabil pada kondisi suhu tinggi karena proses-proses kimia dalam bidang industri banyak yang berlangsung pada suhu relatif tinggi di atas 40°C (Dessy, 2008). Industri penyamakan kulit membutuhkan protease dalam proses *bating*, dimana protease mendegradasi ikatan peptida yang ada dalam kulit tersebut. Proses ini berlangsung pada suhu 53°C (Pelczar, 1986). Kebutuhan enzim protease sangat tinggi, tetapi pemenuhan kebutuhan terhadap enzim protease hampir 100% masih bergantung pada produk impor (Kurniawati, 2012)

Protease bakteri secara ekstensif digunakan dalam industri deterjen. Dimulai tahun 1993, protease dari ekstrak kasar protease ditambahkan pada deterjen laundry untuk mencapai hasil yang lebih baik dalam memindahkan noda proteinaceous. Berbagai jenis enzim terutama protease, dimanfaatkan secara luas di dalam deterjen. Penggunaan enzim di dalam detergen menguntungkan dipandang dari segi lingkungan, karena mengurangi keperluan senyawa fosfat. Akhir tahun 50-an, protease bakteri pertama kali digunakan dalam deterjen komersil. Saat ini protease paling populer untuk digunakan dalam deterjen yang semuanya tergolong protease serin dari *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lichenformis*, *Bacillus* alkali kuat seperti *Bacillus lentus* (Rao dkk., 1998).

## 2.6 Identifikasi Spesies Bakteri Menggunakan *Microbact*

Salah satu cara pengidentifikasian mikroorganisme yaitu dengan menganalisa kemampuan metabolismenya dengan menggunakan suatu metode uji biokimia. Uji biokimia yaitu meliputi kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan berbagai jenis sumber karbon dan senyawa kimia lainnya. Uji biokimia yang beragam dan semakin banyak jenis senyawa pengujian maka akan menghasilkan pengidentifikasian yang spesifik hingga tingkat spesies (Buckle dkk., 1987).

Kit *Microbact* 12E dan *Microbact* 12B adalah identifikasi sistem komersial untuk bakteri secara umum dan bakteri Gram negatif dan Gram positif golongan enterobacter. *Microbact* 12E untuk bakteri Gram negatif dan *Microbact* 12B untuk bakteri Gram positif. Tes ini terdiri dari substrat sebanyak 12 biokimia yang berbeda

tes ditempatkan di sumur *Microbact*. Pengujian dengan menggunakan *Microbact* akan semakin mempermudah metode pengidentifikasian suatu mikroorganisme. *Microbact* mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan pereaksi yang telah distandarisasi. Pengujian dengan *Microbact* memiliki beberapa ketentuan sebelum dilakukan pengujian, yaitu sampel isolat yang digunakan merupakan isolat yang telah dimurnikan dan dilarutkan ke dalam garam fisiologis (Oxoid, 2004).

Prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 jenis. Suspensi bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis ditambahkan ke masing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia. Setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C reagen yang sesuai ditambahkan dan 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*. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Oxoid, 2004).

## 2.7 Pengujian Aktivitas Protease

Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer (1983). Prinsip pengukuran aktivitas protease dengan metode Bergmeyer adalah hidrolisis substrat

oleh protease menjadi asam amino dan peptida. Substrat yang digunakan adalah kasein (Suhartono 1992). Kasein merupakan protein susu yang terdiri atas fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsium kaseinat. Seperti dalam Al-Qura'an surat Adz-Dzariyat [51]: 49 bahwa Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini berpasangan. Seperti halnya Allah menciptakan laki-laki dan perempuan, siang dan malam. Begitu juga enzim diciptakan berpasangan dengan substratnya. Enzim memiliki spesifitas atau kekhasan terhadap substrat (Pelczar dan Chan, 1988). Enzim protease merupakan enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Protease merupakan enzim yang sangat kompleks dan hanya dapat mengkatalisis zat yang mengandung protein misalnya kasein dan albumin (Ward, 1984).

Laju pembentukan peptida dan asam amino tersebut dapat dijadikan tolok ukur aktivitas katalis protease. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease, dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan TCA (*Trichloro Acetic Acid*). Asam amino dan peptida akan dilarutkan dengan TCA, sedangkan protein yang memiliki bobot molekul yang besar akan mengendap. TCA juga berfungsi menginaktifkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis dibantu oleh sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk melalui tahap pemisahan tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease. Supernatan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M dan pereaksi Folin *Ciocalteu*

sehingga warna berubah menjadi hijau kekuningan. Larutan dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi asam amino yang terbentuk. (Dina, 2012). 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  $\mu\text{mol}$  tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013).

## 2.8 Sumber Air Panas Pacet Mojokerto

Manifestasi panas bumi di permukaan adalah sebagai indikasi adanya aktivitas panas bumi di bawah permukaan tersebut. Bentuk manifestasi aktivitas panas bumi di dalam perut bumi itu dapat berupa munculnya mata air panas, munculnya bualan gas ke permukaan tanah, fumarola, solfatara dan tanah panas. Mata air panas yang muncul ke permukaan ini dapat mengandung klorida, bikarbonat ataupun sulfat (Sianturi, 2008).

Sumber air panas merupakan salah satu lingkungan tempat kehidupan bagi beberapa organisme yang tahan terhadap suhu air yang panas tersebut, seperti bakteri, fungi, ataupun alga yang bersifat termofilik. Sebaran sumber air panas hampir merata diseluruh dunia, namun ada wilayah tertentu tempat sumber air panas itu terkonsentrasi (Madigandkk., 2000). Sumber air panas selain memiliki air yang suhunya cukup tinggi juga memiliki suatu aroma khas yaitu berupa aroma hydrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{S}$ ) yang berasal dari aktivitas bakteri anaerob yang menggunakan senyawa-senyawa sulfur (Sianturi, 2008).

Sumber mata air panas Ubalan Pacet terletak di kawasan wisata Ubalan di daerah pegunungan di Desa Padusan Kecamatan Pacet Kabupaten Mojokerto Propinsi Jawa Timur Indonesia. Berada pada ketinggian 800 mdpl di bawah kaki gunung Welirang. Daerah sekitar sumber air panas ini merupakan kawasan Taman Hutan Rakyat (Tahura) R. Soeryo. Jarak dari Kabupaten Mojokerto sejauh 30 km dan kota Batu 29 km. Lokasi ini tepatnya terletak pada  $7^{\circ},41',8.0''$  LS dan  $112^{\circ},32',52.35''$  LT (Anonymous, 2014). Berdasarkan observasi, sumber air panas ini memiliki suhu  $47^{\circ}\text{C}$  dan pH 7 (netral).

