

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL PROTEASE EKSTRASELULER DARI LIMBAH CAIR TAHU PUTIH

Lina Rahmawati R<sup>1</sup>, Salsabila Adlina<sup>1</sup>, Anna Yuliana<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Perjuangan, Jl. Peta 177  
Tasikmalaya, Indonesia

<sup>2</sup> Prodi S1 Farmasi STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya  
Jl. Cilolohan No. 36 Kelurahan Kahuripan Kecamatan Tawang Kota Tasikmalaya 46115

\*E-mail korespondensi: [anna.yuliana@stikes-bth.ac.id](mailto:anna.yuliana@stikes-bth.ac.id)

### ABSTRACT

Protease is an enzyme that can hydrolyze the peptide bonds. The aim of this research was to isolation and characterize the bacteria producing extracellular protease from white tofu liquid waste from home indusrtly in Singaparna. Isolation with nutrient agar medium, as qualitatif test of isolate ability to produce protease with skim milk agar medium show clear zone. Identification bacteria was identified with Gram staining technique, indol test, methyl red test, Voges Proskauer test, Simmon Citrate test, coagulase test, catalase test, and mannitol test. This indicated that bacteria producing extracellular protease of sample is *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** Extracellular protease, *Staphylococcus aures*, white tofu liquid waste.

Diterima: Mei 2021

Direview: 15 Juli 2021

Diterbitkan: 31 Agustus 2021

### ABSTRAK

Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri dan mengetahui karakterisasi bakteri penghasil protease ekstraseluler dari limbah cair tahu putih produksi rumah tangga di Singaparna. Isolasi bakteri dilakukan pada media nutrient agar, sedangkan uji kualitatif kemampuan isolat dalam menghasilkan protease pada media skim milk agar yang menghasilkan zona bening. Identifikasi bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram dan uji biokimia yang meliputi uji indol, uji methyl red, uji Voges Proskauer, uji Simmon Citrat, uji koagulase, uji katalase, dan uji manitol. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri penghasil protease pada sampel adalah *Staphylococcus aureus*.

**Kata Kunci :** Protease ekstraseluler, *Staphylococcus aureus*, limbah cair tahu putih.

### PENDAHULUAN

Industri tahu merupakan salah satu industri yang menghasilkan limbah organik. Limbah industri tahu yang dihasilkan dapat berupa limbah padat dan cair, tetapi limbah cair memiliki tingkat pencemaran lebih besar dari pada limbah padat. Bahan utama pembuatan tahu adalah kedelai, dimana tahu adalah suatu olahan dari ekstrak kedelai yang dilakukan dengan penambahan asam cuka. Limbah tahu banyak mengandung protein dan karbohidrat tinggi sehingga

pembusukan oleh mikroorganisme pembusuk sangat mudah terjadi.

Industri tahu dalam proses pengolahannya menghasilkan limbah baik limbah padat maupun limbah cair. Limbah padat dihasilkan dari proses penyaringan dan penggumpalan, limbah ini kebanyakan oleh pengrajin dijual dan diolah menjadi tempe gembus, kerupuk ampas tahu, dan pakan ternak. Limbah padat tahu berupa kotoran hasil pembersihan kedelai (batu, tanah, kulit kedelai, dan benda padat lain yang

menempel pada kedelai) dan sisa saringan bubur kedelai yang disebut dengan ampas tahu, limbah cairnya dihasilkan dari proses pencucian, perebusan, pengepresan dan pencetakan tahu, oleh karena itu limbah cair yang dihasilkan sangat tinggi (Dewi,2020).

Salah satu jenis limbah yang dihasilkan oleh industri pangan adalah limbah dari industri tahu, makanan yang telah lama dikenal masyarakat indonesia dan merupakan sumber protein murah serta proses pembuatannya mudah.

Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Untuk melakukan aktivitasnya, protease membutuhkan air sehingga dikelompokkan kedalam kelas hidrolase. Protease berperan dalam sejumlah reaksi biokimia seluler. Selain diperlukan untuk degradasi senyawa protein nutrien, protease terlibat dalam sejumlah mekanisme patogenesis, sejumlah proses pasca translasi protein, dan mekanisme ekspresi ekstraseluler. Enzim protease berguna untuk kebutuhan industri seperti untuk detergen, pasta gigi, industri penyamakan kulit, medis dan lain-lainnya (Utami, 2018). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri dan mengetahui karakterisasi bakteri penghasil protease ekstraseluler dari limbah cair tahu putih produksi rumah tangga di Singaparna.

## **METODE PENELITIAN**

### **Isolasi Bakteri Penghasil Protease**

Sampel limbah cair tahu diinokulasikan dalam medium Nutrient Broth, dan diinkubasi 48 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 0,1 mL sampel dari medium pengayaan ditumbuhkan secara sebaran pada medium NA dan diinkubasi 48 jam (Budiman, 2018). Dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada media NA. Koloni yang menunjukkan kenampakan yang berbeda ditumbuhkan pada medium NA secara goresan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk mendapatkan isolat murni (Winahyu, 2019).

### **Penapisan Kualitatif Kemampuan Isolat dalam Menghasilkan Protease**

Satu ose koloni digoreskan pada medium SMA. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan diamati terbentuknya zona jernih pada masing-masing koloni. Koloni yang membentuk zona jernih merupakan penghasil protease dan digunakan untuk penelitian (Winahyu, 2019)

### **Identifikasi Bakteri**

#### **Uji Indol**

Bakteri dibiakan dalam media larutan pepton 1-2 mL selama 24 jam pada suhu 37°C, setelah 24 jam ditambahkan pereaksi Kovacs. Biarkan 5 menit, bila timbul warna merah pada lapisan amil alkohol dari pereaksi Kovacs maka menunjukkan hasil positif (Ken, 2019).

### **Uji Metil Merah**

Bakteri dibiakkan dalam media MR-VP selama 24 jam pada suhu 37°C. Diambil 2 mL biakan, kemudian tambahkan 2 tetes larutan metil merah, bila warna berubah menjadi merah muda menunjukkan hasil positif (Mahtuti, 2019).

### **Uji Voges Proskauer**

Bakteri dibiakkan dalam media MR-VP selama 24 jam pada suhu 37°C. Diambil 1 mL biakan, tambahkan 0,5 mL larutan  $\alpha$ -naftol 6 % dan 1 mL larutan KOH 16 %. Kocok kuat dan biarkan 10 menit pada suhu kamar. Reaksi dinyatakan positif bila warna berubah menjadi merah kecoklatan berupa cincin dipermukaan tabung yang nantinya akan menjalar ke bawah (Haryati, 2020).

### **Uji Simmon Citrate**

Bakteri diambil satu jarum ose, ditanam pada media Simmon citrat dengan cara menggoreskan jarum ose runcing secara zig-zag. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reaksi dinyatakan positif bila timbul warna biru tua terang (Haryati, 2020).

### **Uji Katalase**

Biakan murni bakteri dari agar miring diambil satu ose dan dioleskan keatas kaca objek. Kemudian ditetesi larutan hidrogen peroksida 3%. Reaksi dinyatakan positif bila muncul gelembung gas (Amaliah, 2018).

### **Uji Koagulase**

Uji koagulase dilakukan dengan penyiapan media plasma sebanyak 1-2 tetes pada gelas objek, kemudian dengan

menggunakan ose bulat, koloni bakteri diambil dari media Nutrient Agar lalu dicampurkan dengan media plasma tadi. Setelah itu, diamati langsung reaksi yang terjadi. Hasil dikatakan positif bila terjadi aglutinasi atau penggumpalan yang berarti bakteri tersebut mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Amaliah, 2018).

### **Uji Manitol**

Bakteri yang akan diidentifikasi diambil menggunakan ose. Setelah itu, satu ose koloni bakteri ditanamkan kedalam media manitol. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam. Hasil positif ditunjukkan perubahan warna menjadi kuning (Haryati, 2020).

### **Pewarnaan Gram**

Bakteri yang sudah dibiakkan dioleskan pada kaca objek yang sudah ditetesi NaCl, biarkan kering. Fiksasi diatas nyala api 3 kali, dan dinginkan. Preparat ditetesi larutan kristal violet 0,5 % sampai menutupinya, diamkan 30 detik, bilas dengan air zat warna yang berlebih. Tambahkan larutan lugol selama 30 detik, bilas dengan air. Hilangkan warnanya dengan menambahkan alkohol 96% selama 10-20 detik, bilas dengan air. Tetesi preparat dengan larutan safranin 0,25 % selama 30 detik, bilas dengan air dan biarkan mengering. Setelah kering, teteskan 1 tetes minyak imersi .

Amati dibawah mikroskop. Bila hasil pengamatan berwarna ungu, berarti bakteri gram positif. Sedangkan keberadaan bakteri gram negatif

dinyatakan bila hasil pengamatan berwarna merah (Amaliah, 2018).

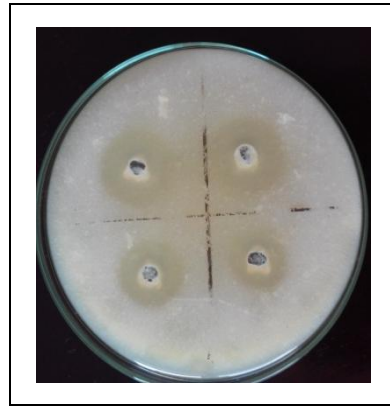
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Penapisan Kualitatif Kemampuan Isolat dalam Menghasilkan Protease**

Pada tahap ini merupakan tahap paling sulit dalam menemukan konsentrasi pembuatan media *Skim Milk Agar* (SMA). Karena diperlukan konsentrasi yang optimum untuk pertumbuhan bakteri. Diameter zona bening yang dihasilkan rata-rata  $34,47 \pm 0,2$  mm.

Susu skim mengandung kasein yang disertakan 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 dalam molekul. Reaksi tersebut melepaskan asam amino.

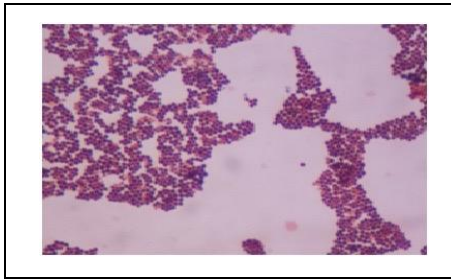
Susu skim tersuspensi dalam medium. Setelah inokulasi dan inkubasi kultur plate agar, bakteri mensekresikan protease. Hal ini diperlihatkan dengan adanya daerah bening disekeliling pertumbuhan bakteri. Luasnya daerah bening di sekeliling pertumbuhan bakteri tidak mewakili jumlah protease yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme. Karena daerah bening yang dihasilkan akan bertambah dengan bertambahnya waktu inkubasi (Winahyu, 2019).



**Gambar 1.** Hasil penapisan kualitatif kemampuan isolat dalam menghasilkan protease

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengelompokkan bakteri menjadi 2 yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pada pewarnaan Gram, hasil yang didapat akan ditentukan dari komposisi dinding sel pada bakteri. Pada pewarnaan Gram ini, reagen yang digunakan ada 4 jenis, yaitu kristal violet, lugol, etanol dan safranin (Maristiasa, 2019).

Hasil dari pewarnaan Gram dari sampel limbah cair tahu putih yang tumbuh pada media NA pada perbesaran 1000 kali menunjukkan bakteri berwarna ungu dan berbentuk bulat bergerombol seperti buah anggur. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel bakteri dan mengetahui kemurnian sel bakteri. Pada penelitian ini morfologi sel isolat adalah Gram positif, berbentuk kokus tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur, menyerupai buah anggur (Yuliana, 2015).



**Gambar 2.** Hasil Uji Pewarnaan Gram

Uji koagulase merupakan uji yang dapat mengidentifikasi bahwa bakteri tersebut termasuk kedalam genus *Staphylococcus* tetapi karena mempunyai tiga spesies maka untuk mengetahui spesiesnya perlu dilakukan uji pertumbuhan manitol dan glukosa dalam kondisi anaerob, apabila bakteri tersebut menghasilkan reaksi positif maka termasuk spesies *Staphylococcus aureus*.

Hasil Uji Biokimia bisa dilihat pada Tabel 1, menunjukkan bahwa sampel uji positif pada uji koagulase, katalase, metil red, VP dan manitol.

**Tabel 1.** Uji Biokimia

Uji	Positif	Negatif	Hasil Sampel Uji
Koagulase	Menggumpal	Tidak Bereaksi	+
Katalase	Bergelembung	Tidak Bereaksi	+
Indol	Merah	Kuning	-
Metil Red	Merah	Kuning	+
Vp	Merah	Kuning	+
Sitrat	Biru	Hijau	-
Manitol	Kuning	Kuning Hitam	+

Pada uji koagulase dan katalase, sampel uji mampu memecah  $H_2O_2$  karena komponen  $H_2O_2$  ini merupakan salah satu hasil respirasi aerobik bakteri dimana hasil respirasi tersebut justru

dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena bersifat toksik bagi bakteri itu sendiri. Oleh karena itu, komponen ini dipecah oleh bakteri agar tidak bersifat toksik

Pada uji Indol, sampel tidak dapat memproduksi indol karena saat biakan dalam medium Tryptone Broth yang diinkubasi menghasilkan warna kuning karena direaksikan dengan peraksi KOVAC'S.

Hasil metil red menunjukkan warna merah karena adanya konsentrasi asam yang tinggi ditandai dengan indikator metal merah setelah diinkubasi selama 5 hari, produksi asam merupakan hasil fermentasi karbohidrat.

Hasil Uji VP (Voges Proskauer) Sampel uji mampu memfermentasikan medium MR-VP yang mengandung glukosa sehingga menghasilkan asetil metil karbinol yang ditandai dengan perubahan menjadi merah.

Uji Sitrat menunjukkan hasil negatif karena tidak ada perubahan warna atau kekeruhan pada medium yang berarti bahwa sampel uji tidak mampu memfermentasi sitrat.

Hasil uji pada medium Manitol Test Medium, sampel hanya tumbuh digaris tusukan saja dan tidak menyebar. Garis tumbuh menghasilkan warna ungu. Dari hasil uji biokimia dan pewarnaan Gram yang dilakukan maka sampel uji diduga bakteri *Staphylococcus aureus*.

**DAFTAR PUSTAKA / REFERENCE**

- Amaliah Zakiyah Z, dkk. 2018. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia, Vol 5 (1) 253-257: Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai.*
- Bagian Biokimia FKUI. 2013. *Biokimia Eksperimen Laboratorium.* Widya Medika : Jakarta.
- Bacteriological Analytical Manual (BAM), 1998, Food And Drug Administration USA: AOAC International*
- Budiman, A., Rusnawan, D.W. and Yuliana, A., 2018. Antibacterial activity of Piper betle L. extract in cream dosage forms against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acne*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 10(3)*, pp.493-496.
- Dewi, Moni O dan Tauny Akbari. 2020. Pengolahan Limbah Cair Tahu Dengan Metode Fitoremediasi Tanaman Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) Pada Industri Tahu B di Kota Serang. Vol 3, No.1 Februari 2020. e-ISSN:26228785.P-ISSN:26224984.
- Dewi, Amalia Krishna. 2013. *Jurnal SainVeteriner ISSN: 0126-0421.* Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap susu kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta.
- Haryati Kristina. 2020. *JPHPI Volume 23 Nomor 3 Hal 486-494: Pengujian Kualitas Mikrobiologi Ikan Ekor Kuning Asap Dari Pasar Youtefa Papua.*
- Ken Retno, dkk. 2019. *Jurnal Biota Vol. 4 (1): 8-15, Februari 2019.* Peranan Bakteri Indigenus dalam Degradasi Limbah Cair Pabrik Tahu. ISSN: 2527-323X.
- Mahtuti Erni Y dan Farahdita Devi M. 2019. *Prosiding SemNas Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas PGRI Ronggolawe Tuban: Karakterisasi Bakteri Limbah Cair Laboratorium Analisis Kesehatan Sebagai Pendegradasi Limbah.* ISSN: 2580-3913.
- Maristiasa Nadhila P, dkk. 2019. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus. Vol 2: Isolasi Dan Uji Tingkat patogenitas Bakteri proteolitik untuk Bioremediasi Limbah Industri Tahu.* ISSN: 2580-3913. ISSN:2654-766X.
- Novel, Sinta Sasaki, dkk. 2010. *Praktikum Mikrobiologi Dasar.* Jakarta : CV. Trans Info Media.
- Pratita, Maria Yuli Endah. 2012. *Jurnal Teknik Pomtis Vol.1, No.1, (2012) 1-5.* Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Mata Air Panas di Songgoriti Setelah Dua Hari Inkubasi. Fakultas MIPA . ITS.

- Safitri, Ratu. 2010. *Medium Analisis Mikroorganisme (Isolasi dan Struktur)*. Jakarta : CV.Trans Info Media.
- Saryono. 2011. *Biokimia Enzim*. Yogyakarta : Nuha medika.
- Sinaga, Ernawati. 2012. *BIOKIMIA DASAR*. Jakarta : ISFI Penerbitan.
- Suningsih, Rita Fitri. 2013. *Penggunaan Limbah Tahu sebagai Substituen Nutrient pada Media Pertumbuhan*. [Skripsi].STIKes Bhakti Tunas Husada Tasikmalaya.
- Utami, Linda A dan Agung Suprihadi. 2018. *Jurnal Berkala Bioteknologi Vol 1, No. 1, April 2018: Pemanfaatan Limbah Tahu sebagai Media Pertumbuhan Aspergillus flavus DUCC-K225 untuk Produksi Enzim Protease*.
- Winahyu P, dkk. 2019. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus. Vol 2. 2019: Isolasi Bakteri Indigenous Penghasil Enzim Protease dari Limbah Cair Industri Tempe*. ISSN:2654-766X
- Wirahadikusuma, Muhammad. 2008. *Biokimia Protein, enzim & asam nukleat*. Bandung : ITB.
- Yuliana, A., 2015. Uji Aktivitas Antijamur Formulasi Emulsi Minyak Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L. Merr). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi*, 11(1), pp.46-58.