

## Produksi Enzim Protease *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* Hasil Isolasi dari Lumpur Kubangan Babi dengan Variasi Substrat Putih Telur

Dewi Astriany\*, Syarif Hamdani, Handi Wilianto  
Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Bandung, Indonesia

\*Corresponding author: dewiastriany@stfi.ac.id

### Abstract

The protease enzyme is one of the enzymes that is widely used in industry and can be obtained from microorganisms. This enzyme is very important in the process of protein breakdown and absorption. The production of protease enzymes from microorganisms was influenced by several factors such as temperature, pH, source of inorganic salts, carbon, nitrogen, and type of substrate. This study was conducted to find the type of substrate that can increase the production of protease enzymes with the high activities. The proteolytic test was carried out on fourteen bacterial isolated from the mud of a pig's wallow using skim milk agar (SMA) media with the addition of substrates. Bacterial isolates were inoculated on nutrient agar media by streak plate method. The types of substrates used were domestic chicken egg white, native chicken egg white, duck egg white, and quail egg white. Isolation of proteases was carried out by centrifugation at 4°C. From the results of the proteolytic test of fourteen bacterial isolates, two bacteria that had proteolytic activity were obtained, namely, *Bacillus altitudinis* and *Pseudomonas citronellolis*. The most suitable substrate used for the production of protease enzymes is chicken egg white, with protease activity of *Bacillus altitudinis* was 0.062 Unit/mL and *Pseudomonas citronellolis* was 0.059 Unit/mL.

**Keywords:** Protease enzyme, *Bacillus altitudinis*, *Pseudomonas citronellolis*, Egg Whites, Substrate.

### Abstrak

Enzim protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri dan dapat diperoleh dari mikroorganisme. Enzim ini sangat penting dalam proses pemecahan dan absorpsi protein. Produksi enzim protease dari mikroorganisme dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, sumber garam-garam anorganik, karbon, nitrogen, dan jenis substrat. Penelitian ini dilakukan untuk menemukan jenis substrat yang dapat meningkatkan produksi enzim protease dengan aktivitas yang tinggi. Uji proteolitik dilakukan terhadap empat belas isolat bakteri yang diisolasi dari lumpur kubangan babi menggunakan media *skim milk agar* (SMA) dengan penambahan substrat. Isolat bakteri diinokulasikan pada media *nutrient agar* dengan metode *streak plate*. Jenis substrat yang digunakan adalah putih telur ayam negeri, putih telur ayam kampung, putih telur bebek, dan putih telur burung puyuh. Isolasi protease dilakukan dengan sentrifugasi pada suhu 4°C. Dari hasil uji proteolitik empat belas isolat bakteri, diperoleh dua bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik yaitu, *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis*. Substrat yang paling sesuai digunakan untuk produksi enzim protease adalah putih telur ayam kampung, dengan aktivitas protease dari *Bacillus altitudinis* sebesar 0,062 Unit/mL dan *Pseudomonas citronellolis* sebesar 0,059 Unit/mL.

**Kata kunci:** Enzim protease, *Bacillus altitudinis*, *Pseudomonas citronellolis*, substrat, putih telur.

### PENDAHULUAN

Enzim adalah molekul protein yang berperan sebagai biokatalis dan berfungsi untuk mengkatalisis reaksi-reaksi metabolisme yang berlangsung pada makhluk hidup. Fungsi ini dipengaruhi oleh faktor lingkungannya seperti suhu, keasaman (pH), konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, adanya inhibitor dan aktivator. Pada kondisi tertentu, laju reaksi enzimatik akan bekerja secara optimum,

sehingga diperoleh produk yang lebih banyak. Kecepatan reaksi enzimatik akan bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim dan substrat, akan tetapi laju reaksi dapat mencapai konstan bila jumlah substrat bertambah terus sampai melewati batas kemampuan enzim (Vitulo, 2020).

Hingga tahun 2018, hampir 99% kebutuhan enzim di Indonesia saat ini masih diimpor dari

luar negeri seperti Cina, India, Jepang, dan sebagian dari negara-negara Eropa. Kebutuhan enzim dan permintaan pasar global terhadap enzim pada rentang waktu tahun 2015-2020 cenderung meningkat sekitar 7% setiap tahunnya. Konsumsi enzim oleh industri di Indonesia diperkirakan mencapai 2.500 ton dengan nilai impor sekitar 200 miliar rupiah pada tahun 2017 dengan laju pertumbuhan volume rata-rata 5-7% per tahun. Nilai tersebut cukup besar untuk dijadikan dasar pertimbangan dalam mendorong upaya kemandirian Indonesia dalam memproduksi enzim (Simamora dkk., 2018).

Salah satu jenis enzim yang penggunaannya sangat luas adalah enzim protease karena memiliki nilai ekonomi yang tinggi dalam bidang industri, antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi dan pada proses pengolahan limbah industri (Razzaq et al., 2019). Protease merupakan salah satu dari tiga kelompok enzim terbesar dari industri enzim dan merupakan 65% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia (Yuniati dkk., 2015).

Sebagai upaya untuk memenuhi kebutuhan enzim di Indonesia, maka diperlukan pencarian metode untuk meningkatkan produksi enzim dengan memanfaatkan bahan asal Indonesia yang potensial. Enzim protease sebagai agen proteolitik dapat diperoleh dari bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* yang diisolasi (Nagamalli, 2017). Pada penelitian ini dilakukan isolasi dengan menumbuhkan bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* dalam substrat yang bervariasi yaitu telur ayam negeri, telur ayam kampung, telur bebek dan telur puyuh. Kandungan protein yang tinggi pada telur menjadi bahan fungsional untuk metabolisme mikroorganisme dalam memproduksi enzim (Jainab & Sultana, 2021). Enzim protease yang dihasilkan kemudian ditentukan nilai aktivitasnya.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Bahan**

Bakteri yang digunakan adalah *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia. Bahan yang digunakan antara lain kasein, *nutrient agar* (Oxoid), *nutrient broth* (Oxoid), *trypton soy broth* (Oxoid), NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, bubuk susu, tirosin, tripton (Oxoid), *yeast extract* (Oxoid), telur ayam negeri, telur ayam kampung, telur bebek, dan telur puyuh.

### **Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator (Memmert), autoklaf, oven (Memmert), neraca analitik (Ohaus®), *Laminar Air Flow* (Ersa Scientific), sentrifugator (Tomy MX-305®), *magnetic stirrer*, dan *syringe* (Terumo).

### **Metode**

#### **Identifikasi bakteri penghasil protease**

Uji kualitatif dilakukan setelah mendapatkan isolat tunggal dari empat belas bakteri yang telah ditumbuhkan dalam *nutrient agar*. Masing-masing isolat bakteri diinokulasikan pada medium selektif *skim milk agar* (SMA), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Hasil yang menandakan bahwa bakteri mampu mendegradasi protein dengan baik ditunjukkan melalui terdapatnya zona bening di sekitar koloni bakteri. Selanjutnya hasil isolat dari uji kualitatif tersebut diuji menggunakan 1 mL substrat putih telur yang dicampurkan ke dalam media SMA. Pada isolat yang memiliki zona bening, indeks proteolitiknya dihitung (Pérez-Santaescolástica et al., 2018).

#### **Pembuatan kurva pertumbuhan**

Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Tryptone Soy Broth* (TSB) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 10% kultur diinokulasikan kembali ke dalam 50 mL TSB. Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengukur turbiditas atau kekeruhan suspensi kultur. Pengukuran OD (*optical density*) pada panjang gelombang 600 nm dilakukan setiap 3 jam hingga mencapai fase stationer.

### Produksi dan isolasi ekstrak kasar protease

Bakteri ditumbuhkan dalam 50 mL media cair dengan komposisi sebagai berikut: putih telur 1 %; tripton 0,01%; yeast extract 0,05%; NaCl 0,1%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01%; dan CaCl<sub>2</sub> 0,01%. Sebanyak 10% kultur dari media inokulum pertama dimasukkan ke dalam media produksi dan dikocok dengan kecepatan 160 rpm sampai substrat habis. Larutan hasil produksi enzim disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak protease kasar. Supernatan yang mengandung enzim ini kemudian diuji aktivitasnya.

### Uji aktivitas enzim protease

Pengujian aktivitas enzim protease dilakukan menggunakan metode Kunitz dengan modifikasi (Bacha et al., 2017; Mohan et al., 2018). Sebanyak 1 mL larutan ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan kasein 1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, 3 mL larutan TCA 5% ditambahkan, dikocok lalu didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit, selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit.

Kontrol positif yang digunakan adalah larutan enzim sebanyak 1 mL yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan kasein 1% sebanyak 1 mL serta tirosin 1 ppm, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya 3 mL larutan *Trichloroacetic Acid* (TCA) ditambahkan, lalu didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian disentrifugasi selama 15 menit.

Kontrol negatif yang digunakan adalah 1 mL kasein 1% tanpa penambahan ekstrak enzim kemudian diinkubasi selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan 3 mL larutan *Trichloroacetic Acid* (TCA) dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit, lalu disentrifugasi selama 15 menit.

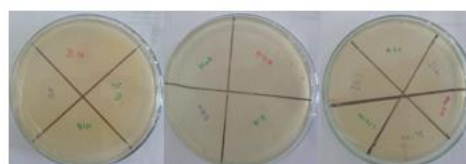
Pengukuran aktivitas enzim dilakukan menggunakan metode spektrofotometri. Larutan sampel diukur absorbansinya pada

panjang gelombang 288 nm. Tirosin digunakan sebagai standar untuk membuat kurva baku. Aktivitas enzim protease dihitung dalam satuan U (unit)/mL ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan µmol tirosin tiap menit dengan putih telur sebagai substrat.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi bakteri penghasil enzim protease

Identifikasi bakteri penghasil enzim protease dilakukan secara kualitatif pada empat belas isolat bakteri murni yang ditumbuhkan pada media SMA (*Skim Milk Agar*). Hasil uji menunjukkan tidak semua isolat bakteri tersebut memiliki aktivitas proteolitik. Zona bening yang terbentuk pada beberapa isolat bakteri tersebut yang memiliki aktivitas proteolitik dapat dilihat pada Gambar 1.

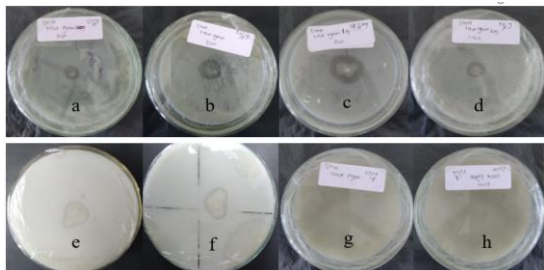


**Gambar 1.** Uji proteolitik isolat bakteri yang berasal dari lumpur kubangan babi.

Dari hasil uji kualitatif, diperoleh dua isolat bakteri yang menghasilkan zona bening, yaitu bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis*.

Identifikasi bakteri penghasil enzim protease dilakukan pada isolat bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* pada media SMA dengan penambahan substrat putih telur ayam negeri, putih telur ayam kampung, putih telur bebek, dan putih telur burung puyuh. Aktivitas proteolitik ditandai dengan adanya zona bening yang terbentuk dari hasil aktivitas enzim protease yang dihasilkan dari kedua bakteri tersebut. Hasil dari uji proteolitik bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* terhadap masing-masing substrat menunjukkan adanya zona bening terhadap substrat putih telur ayam negeri, putih telur ayam kampung dan putih telur bebek, sedangkan pada putih telur

burung puyuh tidak menunjukkan adanya zona bening yang terbentuk. Hasil uji proteolitik terhadap substrat dari kedua bakteri tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Hasil uji proteolitik bakteri terhadap substrat putih telur dengan (a) *B. altitudinis* dengan putih telur ayam, (b) *P. citronellolis* dengan putih telur ayam, (c) *B. altitudinis* dengan putih telur ayam kampung, (d) *P. citronellolis* dengan putih telur ayam kampung, (e) *B. altitudinis* dengan putih telur bebek, (f) *P. citronellolis* dengan putih telur bebek, (g) *B. altitudinis* dengan putih telur puyuh, dan (h) *P. citronellolis* dengan putih telur puyuh

**Tabel 1.** Nilai indeks proteolitik *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis*

Substrat	Nilai Indeks Proteolitik	
	<i>B. altitudinis</i>	<i>P. citronellolis</i>
Putih telur ayam negeri	0,33	0,2
Putih telur ayam kampung	1,2	1,11
Putih telur bebek	0,17	0,19
Putih telur burung puyuh	0	0

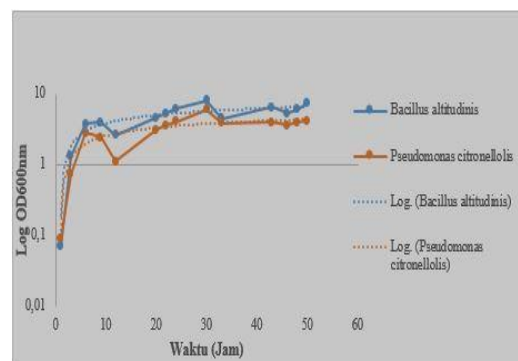
Zona bening yang dihasilkan merupakan hasil hidrolisis protein dari putih telur yang berperan sebagai substrat dalam media yang disebabkan karena aktivitas dari enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri tersebut.

Bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* yang memiliki aktivitas proteolitik terhadap masing-masing substrat putih telur kemudian dihitung nilai indeks proteolitiknya. Hasil perhitungan nilai indeks proteolitik dari bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas*

*citronellolis* terhadap masing-masing substrat putih telur dapat dilihat pada Tabel 1.

### Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis*

Hasil pengamatan pada pertumbuhan dari bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis*.

Pengukuran *optical density* (OD) dari bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* bertujuan untuk melihat fase stasioner dari kedua bakteri ini, dimana fase tersebut digunakan untuk menentukan kondisi produksi enzim protease protein yang diinginkan.

Pertumbuhan dari bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* melalui empat fase, yaitu fase lag, fase log/eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Fase lag adalah periode adaptasi dimana bakteri menyesuaikan diri dengan kondisi baru, dilanjutkan dengan pembelahan sel yang sangat cepat saat dicapai kondisi yang optimal (fase log). Pada fase stasioner, populasi bakteri telah kehabisan nutrisi esensial sehingga pertumbuhan berhenti. Fase terakhir dari kurva pertumbuhan (fase kematian) terjadi ketika sel kehilangan viabilitasnya, dan sel tidak akan tumbuh bila dipindahkan ke media segar (Jainab & Sultana, 2021).

Fase lag pada bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* terjadi pada jam ke 1-12. Fase log Bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* terjadi pada jam ke

12-30. Fase stasioner dari bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* terjadi pada jam ke 33-48.

### Produksi, isolasi dan uji aktivitas ekstrak kasar enzim protease

Produksi enzim protease menggunakan substrat putih telur ayam kampung memberikan hasil indeks proteolitik yang besar dibandingkan yang menggunakan substrat putih telur lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian dimana putih telur ayam kampung memiliki jumlah protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan putih telur ayam, putih telur bebek dan putih telur burung puyuh (English, 2021). Aktivitas enzim protease ditentukan dengan menggunakan metode Kunitz. Pada penentuan ini digunakan putih telur ayam kampung sebagai substrat, dimana enzim protease yang disekresikan oleh bakteri akan menghidrolisis protein untuk menghasilkan asam amino. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis protein akan dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis dengan menggunakan asam trikloroasetat yang juga berfungsi sebagai menginaktivasi protease serta menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama masa inkubasi dengan protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis dibantu oleh sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk melalui tahap pemisahan tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis protein yang ada pada substrat oleh enzim protease. Tirosin digunakan sebagai larutan standar dalam menentukan aktivitas enzim protease dalam proses pemecahan protein menjadi asam amino.

Persamaan linear dari tirosin akan digunakan sebagai kurva baku untuk diinterpolasikan dengan nilai absorbansi yang diperoleh. Aktivitas enzim protease terhadap kontrol negatif, kontrol positif, dan substrat dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil uji aktivitas enzim protease

Bakteri	Aktivitas enzim protease (Unit/mL)		
	Kontrol (+)	Kontrol (-)	Sampel
<i>Bacillus altitudinis</i>	0,124	0	0,062
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	0,088	0	0,059

Keterangan:

- Kontrol positif : 1 mL larutan enzim, 1 mL kasein 1%, tirosin 1 ppm, 3 mL TCA 5%
- Kontrol negatif: 1 mL kasein 1%, 3 mL TCA 5%
- Sampel: 1 mL larutan enzim, 1 mL kasein 1%, 3 mL TCA 5%.

Pemisahan pada penentuan aktivitas enzim protease menggunakan sentrifugasi 4°C bertujuan untuk mencegah terjadinya kerusakan pada enzim dan menjaga agar tidak terjadinya penurunan aktivitas pada enzim yang telah dihasilkan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas citronellolis* dapat menghasilkan enzim protease dengan menggunakan substrat putih telur ayam kampung, begitu pula dengan bakteri *Bacillus altitudinis* yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut juga dapat menghasilkan enzim protease dengan menggunakan substrat putih telur ayam kampung, hal ini sesuai dengan penelitian yang menunjukkan bahwa *Bacillus altitudinis* dapat secara efisien menghasilkan enzim protease (Nagamalli et al., 2017).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa enzim protease dari bakteri *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* dapat diproduksi dengan menggunakan substrat putih telur ayam kampung, dengan aktivitas enzim protease yang dihasilkan adalah sebesar 0,062 Unit/mL untuk bakteri *Bacillus altitudinis* dan 0,059 Unit/mL untuk bakteri *Pseudomonas citronellolis*. Penelitian lebih lanjut sebaiknya dilakukan untuk memperoleh enzim protease murni melalui beberapa metode pemurnian yang sesuai.

### DAFTAR PUSTAKA

Bacha, A. Ben, Jemel, I., Moubayed, N.M.S. & Abdelmalek, I. Ben. 2017. Purification

- and characterization of a newly serine protease inhibitor from *Rhamnus frangula* with potential for use as therapeutic drug. *3 Biotech.* 7(2):1–13.
- English, M.M. 2021. The chemical composition of free-range and conventionally-farmed eggs available to Canadians in rural Nova Scotia. *PeerJ.* 9:1–16.
- Jainab, T. & Sultana, S. 2021. Effects of Cultural Conditions on the Production of Extracellular Protease by *Bacillus circulans* Isolated from Dried Fish. *Journal of Microbiology Research.* 2021(2):33–39.
- Mohan, M., Kozhithodi, S., Nayarisseri, A. & Elyas, K.K. 2018. Screening, Purification and Characterization of Protease Inhibitor from *Capsicum frutescens*. *Bioinformation.* 14(06):285–293.
- Nagamalli, H., Sitaraman, M., Kandalai, K.K. & Mudhole, G.R. 2017. Chicken egg shell as a potential substrate for production of alkaline protease by *Bacillus altitudinis* GVC11 and its applications. *3 Biotech.* 7(3).
- Pérez-Santaescolástica, C., Carballo, J., Fulladosa, E., Garcia-Perez, J. V., Benedito, J. & Lorenzo, J.M. 2018. Effect of proteolysis index level on instrumental adhesiveness, free amino acids content and volatile compounds profile of dry-cured ham. *Food Research International.* 107(2017):559–566.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. & Ashraf, M. 2019. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 7(JUN):1–20.
- Simamora, M, Maulana S., Yaman A. 2018. Kajian Pendahuluan Analisis Kebutuhan Pasar Produk Enzim Dalam Negeri Untuk Mendukung Pengembangan Sektor Hulu Industri Biorefinery. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. [http://lipi.go.id/publikasi/kajian-pendahuluan-analisis-kebutuhan-pasar-produk-enzim-dalam-negeri-untuk-mendukung-pengembangan-sektor-](http://lipi.go.id/publikasi/kajian-pendahuluan-analisis-kebutuhan-pasar-produk-enzim-dalam-negeri-untuk-mendukung-pengembangan-sektor-hulu-industri-biorefinery/21319)
- [hulu-industri-biorefinery/21319](http://lipi.go.id/publikasi/kajian-pendahuluan-analisis-kebutuhan-pasar-produk-enzim-dalam-negeri-untuk-mendukung-pengembangan-sektor-hulu-industri-biorefinery/21319). Diakses 10 Desember 2021.
- Vitolo, M. 2020. World Journal of Pharmaceutical Research. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 9(2):60–76.
- Yuniati, R., Nugroho, T.T., Puspita, F. 2015. Uji aktivitas enzim protease dari isolat *Bacillus* sp. Galur lokal riau. *JOM FMIPA.* 1(2):116–122.