

**ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS IROD2 PADA
ONCOM MERAH PASCA FERMENTASI 48 JAM**

**Dwi Pamaya¹, Sakti Imam Muchlissin², Endang Tri wahyuni maharani³, Sri Darmawati⁴,
Stalis Norma Ethica⁵**

¹Health Analytst DIV Study Program, Faculty of Nursing and Health Sciences, Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

email : dwipamaya10@gmail.com

²Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

email : muchlissin@outlook.com

⁵Health Analyst DIII Study Program, Faculty of Nursing and Health Sciences, Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

email : norma@unimus.ac.id

Abstract

Proteolytic bacteria are the bacteria capable of producing extracellular protease enzymes, namely protein-breaking enzymes that are widely used in many industrial fields. This study aimed to isolate a proteolytic bacterium found on 48-h post-fermented oncom and molecular identification method. The initial isolation and purification process of the colony was carried out using Nutrient Agar medium. Selection of protease enzyme obtained by bacterial isolate was done on Milk Skim Agar medium. Identification process of the isolate was done through amplification of 16S rRNA gene using PCR, sequencing and analysis of gene sequences using BLAST program. From the isolation process a bacterial isolate that has proteolytic by the ability to produce a clear zone of 82.00 on plate. The result of the 16S rRNA gene sequence analysis showed that the proteolytic bacterial isolate obtained in this study had a 98% homology level with 16S ribosomal RNA isolate of Bacillus amyloliquefaciens strain A1142 (Genbank access code: KTT722836.1). Based on the results of the molecular identification, the isolate was identified as Bacillus amyloliquefaciens strain IROD2 (IROD2 = Indonesia Red Oncom Day2). As conclusion, from 48-h post fermented red oncom, a protease producing bacterial strain molecularly identified as Bacillus amyloliquefaciens strain IROD2.

Keywords: *Molecularly was identified, Proteolitic bacteria, 16S rRNA gene*

1. PENDAHULUAN

Perkembangan industri enzim telah pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya tekanan dari para ahli dan pecinta lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri (Soeka dkk, 2011).

Dalam industri pengolahan jenis makanan fermentasi, umumnya proses dilakukan dengan mendayagunakan aktivitas metabolisme suatu mikroba atau campuran dari beberapa spesies untuk menghasilkan senyawa tertentu. Iklim Indonesia yang hangat membuat mikroba dapat tumbuh dan berkembang, di Indonesia tidak asing dengan pangan fermentasi karena banyak pangan fermentasi salah satunya adalah oncom (Afifah, 2014).

Oncom adalah makanan asal Indonesia yang populer di daerah Jawa Barat. Makanan ini adalah produk fermentasi yang dilakukan oleh beberapa jenis kapang. Oncom merah didegradasi oleh kapang *Neurospora sitophila* sedangkan oncom hitam didegradasi oleh

kapang *Rhizopus oligosporus*. Kapang oncom mengeluarkan enzim amilase, lipase dan protease yang aktif selama proses fermentasi. Mikroba yang berperan dalam pembuatan pangan fermentasi dapat dikembangkan manfaatnya dalam hal lain, misalnya metabolit yang dihasilkan seperti enzim (Turmala dan Taufik, 2016 ; Nuritasari, 2012).

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu mendegradasi protein, memproduksi enzim protease ekstraseluler. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Untuk mensekresikan protease yang dapat mendegradasikan protein, maka pada medium disertakan susu skim yang mengandung kasein. Kasein merupakan protein utama susu, suatu mikromolekul yang tersusun atas sub unit asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Kasein berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease. Pada umumnya bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus* *Streptobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* (Puspita, 2012).

Saat ini dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (16S *Ribosomal Ribonucleic Acid*/Asam ribonukleat pengkode ribosom istilah 16S rRNA) (Rinanda, 2011).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Afifah (2014), ditemukan 43 isolat yang dapat tumbuh dalam media *skim milk agar* (SMA) dan memiliki potensi menghasilkan protease yang ditandai dengan kemampuannya dalam menghasilkan zona bening pada media SMA. Enam belas isolat (RO1-19) berasal dari oncom merah segar, 11 isolat (ROa-k) berasal dari oncom merah yang telah mengalami perlakuan pemanasan 80°C selama 15 menit, 7 isolat (1-7.g) dari tempe gembus segar, dan 6 isolat (a-f.g) dari yang telah mengalami perlakuan pemanasan 80°C selama 15 menit. Berdasarkan latar belakang penelitian ini, dilakukan karena sebelumnya telah dilakukan isolasi bakteri oncom merah segar tetapi, belum pernah dilaporkan isolasi bakteri proteolitik oncom merah pasca fermentasi.

2. KAJIAN LITERATUR

2.1 Enzim Protease

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, detergen, makanan dan pengolahan limbah. Protease yang digunakan di dalam industri jumlahnya sekitar 60% dari penjualan enzim di dunia. Protease dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti bakteri 44,78%, tanaman 43,85%, dan hewan 11,15%, Protease dari bakteri merupakan jumlah yang paling banyak dibandingkan dengan sumber lain, yaitu protease dari tumbuhan dan hewan. (Kurnia, 2010; Baehaki, 2011).

2.2 Oncom

Oncom merupakan salah satu makanan fermentasi asal Indonesia. Fermentasi yaitu suatu proses metabolisme yang menghasilkan energi dengan cara menguraikan protein, karbohidrat dan lemak tanpa kehadiran oksigen bebas. Bahan baku yang umum digunakan dalam proses pembuatan oncom adalah bungkil kacang tanah atau ampas tahu. Bungkil kacang tanah adalah ampas yang berasal dari kacang tanah yang telah diambil minyaknya dengan proses pemerasan mekanis atau proses ekstraksi, sedangkan ampas tahu merupakan residu pengolahan kedelai menjadi tahu. Ampas tahu sebenarnya masih mempunyai nilai gizi yang cukup tinggi, tetapi kebanyakan sifat organoleptiknya kurang disukai. Ampas tahu dengan proses fermentasi (oncom merah) lebih disukai sebagai makanan dari pada tanpa fermentasi. Proses pembuatan

oncom termasuk jenis fermentasi media padat, yaitu fermentasi yang menyertakan penggunaan substrat padat sebagai sumber karbon, nitrogen, dan energi (Sarwono, 2010; Afifah, 2014)

2.3 Bakteri proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus* dan *Staphylococcus* (Rizaldi dkk, 2016).

2.4 Identifikasi Molekuler Menggunakan PCR 16S rRNA

Identifikasi bakteri yang lebih spesifik dapat dilakukan dengan identifikasi molekuler menggunakan molekul 16S rRNA karena molekul ini bersifat Subkuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Analisis sequencing 16S rRNA sudah banyak digunakan dibidang mikrobiologi. Metode berbasis molekuler ini dinilai lebih cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri serta memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan metode mikrobiologi konvensional. Gen 16S ribosomal RNA (16S rRNA) memiliki daerah yang *conserved* (lestari) sehingga tepat digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis sekuensing untuk menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies (Rinanda, 2011).

2.6 Polymerase Chain Reaction(PCR)

PCR atau *Polymerase Chain Reaction* merupakan teknik amplifikasi DNA secara *invitro*. PCR merupakan cara yang sensitif, selektif dan sangat cepat untuk memperbanyak sekuen DNA yang diinginkan. Adapun prinsip dasar dari PCR yaitu :

1. Denaturasi

Denaturasi tahap awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal (Murray dkk, 2006).

2. Annealing (Penempelan Primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30-45 detik. (Handoyo dan Rudiretna, 2000)

3. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada temperatur 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda. Reaksi-reaksi tersebut di atas diulangi lagi dari 25 – 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan.

3. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini observasi untuk mengetahui adanya bakteri Proteolitik penghasil enzim protease pada oncom pasca fermentasi 48 jam. Populasi penelitian adalah oncom yang dijual di pasar tradisional kota Semarang. Sampel penelitian oncom pasca fermentasi

48 jam. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah secara deskriptif. Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro Semarang. Waktu penelitian dilaksanakan bulan April-Mei 2018.

Alat dan bahan yang digunakan yaitu: neraca analiti, ose, bunsen, lampu spritus, cawan petri, mikropipet, *yellow tip*, *white tip*, mikrotube, inkubator 37°C, mikroskop, autoclave, labu erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, vortex (Thermo Mixer TM205), Mesin PCR, elektroforesis chamber, dan UV transminator. Peralatan lain yang digunakan antara lain aluminium foil, lemari pendingin, alat tulis, dan kamera digital.

Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI, Oxoid), media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA, Oxoid), *Nutrien Agar Plate* (NAP, Oxoid, Gentian violet, Gram iodine, alkohol asam, safranin 1%, Skim Milk Agar (SMA) (Sigma Aldirch, USA), NaCl fisiologis, aquadest steril, buffer lysis, Chelex 100 Resin (Bio Rad). Go Taq Green Master Mix (Promega), etanol 75%, ddH₂O, Primer 27 F, Primer 1492 R, Phosphate Buffer Saline (PBS), Marker 1500bp dan gel agarosa 1%. Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer dan data yang diperoleh ditabulasikan kemudian disajikan dalam bentuk narasi deskriptif.

Teknik analisis yang dilakukan sampel oncom dibeli dipasar, dilakukan lanjutan pasca fermentasi selama 48 jam. Sampel oncom ditimbang ± 1 gram lalu digerus, dimasukkan kedalam tabung pengenceran yang berisi 9 ml *NaCl fisiologis* dengan kode tanpa pengenceran (TP) lalu di vortex hingga homogen kemudian pipet 1 ml masukan pada tabung pengenceran selanjutnya 10^{-1} dan 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , hingga 10^{-5} . Kemudian dilakukan inokulasi dengan media *Nutrient Agar* (NA), inkubasi selama 1x24 jam pada temperatur 37°C dan dilakukan purifikasi hingga didapatkan koloni yang murni. Setelah didapatkan koloni yang murni dilakukan uji penghasil enzim protease menggunakan media susu skim, Isolasi DNA genom bakteri, Amplifikasi gen 16S rRNA, dan sekuensing Produk PCR berupa DNA gen 16S rRNA kemudian dikirim ke ke 1st BASE sequencing INT di Malaysia untuk dilakukan sekuensing. Hasil proses sekuensing adalah urutan gen 16S rRNA bakteri yang kemudian digunakan sebagai input program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Analisis BLAST dilakukan untuk mengetahui tingkat homologi sekuen 16S rRNA yang diperoleh dengan sekuen gen yang sama dari bakteri lain yang sebelumnya telah terdaftar dalam database bank gen (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Urutan basa nitrogen dari isolat terpilih dan strain acuan dianalisis menggunakan program *Molekuler Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA7).

4. HASIL PENELITIAN

4.1 Isolasi dan Purifikasi Bakteri

Isolasi merupakan proses pemindahan organisme dari habitat asli ke dalam habitat baru untuk dikembangbiakkan. Purifikasi merupakan pemurnian atau memisahkan koloni bakteri agar hanya didapatkan bakteri yang murni. Dari hasil pemurnian didapatkan 5 koloni bakteri yang murni dengan kode isolat IROD_{2.1}, IROD_{2.2}, IROD_{2.3}, IROD_{2.4} dan IROD_{2.5} dapat dilihat pada Gambar 1.








Gambar 1. Hasil Isolasi Koloni bakteri

(1) IROD_{2.1} (2) IROD_{2.2} (3) IROD_{2.3} (4) IROD_{2.4} (5) IROD_{2.5}

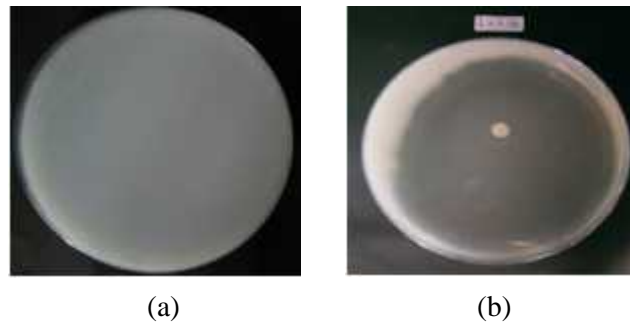
4.2 Pewarnaan Gram Isolat Bakteri

Hasil pewarnaan Gram dari 5 isolat bakteri, isolat bakteri dengan kode isolat IROD2.1 dan IROD2.3 termasuk Gram-Positif dan berbeda dengan kode isolat IROD2.2, IROD2.4, IROD2.5 merupakan Gram-Negatif. Dari kelima koloni diatas dipilih satu bentuk koloni yang unik dalam hal ini mempunyai ciri *irregular, Spreading and Mukoid* untuk dilanjutkan ke tahap molekuler dengan kode IROD2.

No	Kode Sampel	Karakteristik koloni bakteri
1	IROD2.1	 Kokus Gram-Positif
2	IROD2.2	 Basil Gram-Negatif
3	IROD2.3	 Streptobasil Gram-Positif
4	IROD2.4	 Basil Gram-Negatif
5	IROD2.5	 Diplococcus Gram-Negatif

4.3 Uji Bakteri Penghasil Enzim Protease

Dalam pengujian penghasil enzim protease, hasil yang diperoleh yaitu adanya zona bening disekitar media dengan diameter 82,00 yang menandakan adanya bakteri protease yang dapat menghidrolisis protein.



Gambar 1. Hasil Pengujian Aktivitas Penghasil Enzim Protease
(a) SMA (b) Pembacaan zona bening Protease

Uji kualitas dan Kuantitas DNA Genom bakteri

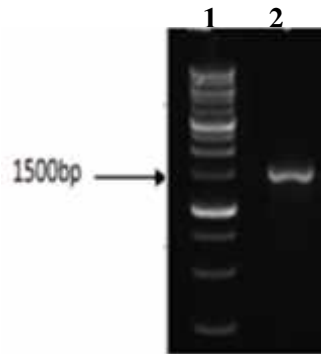
Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA Genom bakteri dapat dilihat pada Tabel. 2

Tabel 2. Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA genom bakteri

No	Kode Sampel	260/280	Unit
1	Blanko	1.53	ng/μl
2	Sampel	1.39	ng/μl

Hasil uji kuantitas dan kualitas DNA yang diperoleh pada penelitian ini, didapatkan hasil pengukuran konsentrasi DNA OD.260/280 : 1.39 ng/μl dan terdapat pita DNA genom.

Amplifikasi Fragmen Gen 16S rRNA metode PCR



Gambar 12. Elektroforesis PCR
DNA Marker (1), DNA sampel (2)

Berdasarkan hasil elektroforesis PCR didapatkan satu untai ganda DNA yang sejajar dengan marker ± 1500 bp sejajar dengan produk amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri IROD₂ dengan demikian dapat dikatakan gen 16S rRNA bakteri dapat di amplifikasi.

4.4 Sekuensing DNA pengkode Gen 16S rRNA

Amplifikasi isolat bakteri yang berhasil selanjutnya dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia yang kemudian akan dikirim ke 1st BASE sequencing INT di Malaysia untuk pemetaan pasang basa. Hasil yang diperoleh dari Malaysia selanjutnya dianalisis pada Gen Bank menggunakan BLAST. Urutan basa nitrogen yang diperoleh mempunyai kemiripan 98% dengan fragmen gen 16S ribosomal RNA isolat bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* strain A1142 (Genbank kode akses: KT722836.1).

5. SIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi dan purifikasi diperoleh 5 koloni dengan bentuk yang berbeda-beda, dari ke 5 koloni dipilih satu koloni bakteri yang unik berbentuk *irregular, spreading and mukoid* dengan aktivitas proteolitik yang ditunjukkan adanya zona bening pada media *Milk Skim Agar* dengan diameter 82,00 mm. Hasil analisis molekuler berbasis sekuens gen 16S rRNA, isolat IROD_{2,3} teridentifikasi sebagai *Bacillus amyloliquefaciens* strain A1142 (Genbank kode akses: KY129662.1) sehingga isolat diberi nama *Bacillus amyloliquefaciens* IROD2 (*IROD2=Indonesian Red Oncom Day-2*). Disarankan kepada peneliti yang lain untuk melakukan penelitian isolasi dan identifikasi bakteri molekuler penghasil protease menggunakan sampel fermentasi yang berbeda.

6. REFERENSI

- Afifah, D.N., 2014. Protease Fibrinolitik Dari Mikroba Pangan Fermentasi Oncom Merah Dan Tempe Gembus. Disertasi. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
- Baehaki, A. and Budiman, A., 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 22(1).
- Bardacki, F. and D. O. F. Skibinski. 1994. Application of the RAPD Technique in Tilapia Fish : Spesies and Subspesies Identification . *Heredity* 73.
- Darmawati, S. 2014. Modul Praktikum Biomolekuler. Program Studi DIV Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Ela Turmala S, D. and Yusman Taufik, D., 2016. Pengaruh konsentrasi inokulum acetobacter aceti dan lama fermentasi terhadap karakteristik vinegar murbei (*Morus alba*) [Effect Of Concentration and Old Acetobacter aceti Inoculum

- Fermentation Characteristics Of Mulberry Vinegar (Morus alba)]* (Doctoral dissertation, Fakultas Teknik Unpas).
- Ethica, S.N., Nataningtyas, D.R., Lestari, P., Istini, I., Semiarti, E., Widada, J. and Raharjo, T.J., 2013. Comparative Evaluation of Conventional Versus Rapid Methods for Amplifiable Genomic DNA Isolation of Cultured *Azospirillum* sp. JG3. *Indonesian Journal of Chemistry*, 13(3), pp.248-253.
- Fatchiyah, Estri, L. A, Sri, W., dan Sri, R. 2011. Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis. Erlangga. Jakarta
- Kurnia, D. R. D. (2010). Studi Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* sebagai biokatalis pada proses gliserolisis untuk menghasilkan monoasilgliserol (phdthesis). Universitas Diponegoro.
- Puspitasari, F.D., Shovitri, M. and Kuswytasari, N.D., 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri aerob proteolitik dari tangki septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1(1), pp.E1-E4.
- Rinanda, T. (2011). Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi Jurnal Kedokteran Syiah Kuala, 11(3), 172–177. article.
- Rohmah, N.S., 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi sebagai Agen Bioremediasi Timbal (Pb) dari Lumpur Lapindo. *Skripsi tidak diterbitkan*.
- Sarwono, B., 2010. Usaha membuat tempe dan oncom. PT Niaga Swadaya.
- Soeka, Y.S., Rahayu, S.H., Setianingrum, N. and Naiola, E., 2011. Kemampuan bacillus licheniformis dalam memproduksi enzim protease yang bersifat alkalin dan termofilik. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 21(2 Jun).