

Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri *Rhizosphere* Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Trenggalek

The Proteolytic Activity on Protease Enzymes from Soybean Plant Rhizosphere (Glycine max L.) in Trenggalek

Nur Fitriana*, Mahanani Tri Asri

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

*e-mail : nur.17030244038@mhs.unesa.ac.id

Abstrak. Bakteri proteolitik merupakan bakteri yang mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino sederhana. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas proteolitik pada enzim protease dari isolat bakteri yang diisolasi dan dikarakterisasi dari *rhizosphere* tanaman kedelai (*Glycine max*. L) di lahan pertanian Trenggalek, Jawa Timur. Penelitian ini dilakukan secara deskriptif kuantitatif. Bakteri yang diperoleh sebanyak tujuh isolat diuji aktivitas proteolitik dengan menggunakan media selektif *Skim Milk Agar* (SMA) ditandai dengan adanya zona bening (*halo zone*) yang terbentuk di sekitar koloni kemudian dikarakterisasi. Uji aktivitas enzim protease dilakukan pada tiga isolat yang membentuk zona bening terbesar dengan menginkubasi pada media selektif *Skim Milk Broth* (SMB) selama 72 jam dengan mengukur aktivitas enzim protease menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm dari hasil inkubasi ke- 0, 4, 24, 48, 72 jam. Hasil Indeks proteolitik dengan zona bening terbesar diperoleh pada tiga isolat IRK1; IRK4 dan IRK7 secara berurutan 2,54, 1,77, dan 1,80. Sedangkan Aktivitas enzim protease pada isolat IRK1, IRK4, dan IRK7 berturut-turut diperoleh hasil eksponensial pada inkubasi 24 jam sebesar 5,97 U/mL, 5,43 U/mL, dan 4,56 U/mL. Sehingga dapat diketahui pada masa inkubasi 24 jam nutrisi yang tersedia memungkinkan sel untuk melakukan pembelahan dan jumlah sel meningkat secara cepat dalam memproduksi enzim protease.

Kata kunci: isolasi; karakterisasi; kedelai; proteolitik; protease

Abstract. Proteolytic bacteria are bacteria that able to hydrolyze protein into simpler amino acids. This study aimed to determine the proteolytic activity of the protease enzymes from bacteria that isolated and characterized from the soybean (*Glycine max*. L) rhizosphere in Trenggalek farmland, East Java. This research was a descriptive quantitative research. The seven isolates bacteria which is obtained were tested for proteolytic activity using *Skim Milk Agar* (SMA) selective media, that characterized by the presence of a clear zone (*halo zone*) that formed around the colony. The protease enzyme activity test was carried out on three isolates that formed the largest clear zone by incubating in *Skim Milk Broth* (SMB) selective media for 72 hours by measuring the protease enzyme activity using a spectrophotometer at a wavelength of 660 nm from the results of incubation 0, 4, 24, 48, 72 hours. The results of the proteolytic index with the largest clear zone were obtained in three isolate IRK1 ; IRK4 and IRK7 respectively are 2.54, 1.77, and 1.80. While the protease enzyme activity in IRK1, IRK4, and IRK7 isolates respectively obtained exponential results at 24-hour incubation are 5.97 U / mL, 5.43 U / mL, and 4.56 U / mL. So it can be seen that during the 24-hour incubation period the available nutrients allow cells to divide and the number of cells increases rapidly in producing the protease enzyme.

Key words: Isolation; characterization; soybean; proteolytic; potease

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L.) merupakan salah satu komoditas tanaman pangan paling penting nomor tiga dari famili leguminosae setelah gramineae (jagung, padi, dan gandum). Kedelai mengandung protein dan lemak tinggi yang memiliki peran dalam pembentukan sel-sel tubuh. Sebesar 75-80% kandungan kedelai berupa protein yang baik, sedangkan 16-20% berupa lemak (Suhardi, 2002). Kedelai mengandung asam amino essensial dan bermanfaat sebagai sumber nutrisi bagi manusia yang terdapat pada pangan (Cahyadi, 2006). Tanaman kedelai (*G. max* L.) menghasilkan senyawa metabolit sekunder pada saat tanaman dalam kondisi yang kekurangan nutrisi atau

pertumbuhan pada masa suboptimal. Metabolit sekunder ini dihasilkan melalui akar yang berperan dalam merangsang perkembangan bakteri di sekitar perakaran tanaman itu sendiri (Widayanti, 2007).

Jumlah bakteri *Actinomycetes* dan cendawan pada *rhizosphere* relatif lebih banyak dibandingkan pada tanah tanpa sistem perakaran atau tidak memiliki *rhizosphere* (Ferfinia, 2010). Terdapat beberapa bakteri yang hidup di daerah *rhizosphere* dengan jumlah yang melimpah diantaranya adalah *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacter*, *Flavobacter*, dan *Cellulomonas*. Bakteri yang banyak ditemukan *rhizosphere* salah satunya yaitu spesies dari bakteri *Bacillus* yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan fitohormon, dapat menghasilkan siderofor, dapat mengikat nitrogen, dan termasuk bakteri proteolitik yang menghasilkan enzim protease yang lebih sederhana (Astuti, 2008). Enzim protease merupakan salah satu enzim penting yang telah dimanfaatkan secara meluas dalam aplikasi bidang industri dan 65% enzim merupakan total penjualan tertinggi di dunia (Chutmanop *et al.*, 2008). Kegunaan enzim protease paling besar banyak dimanfaatkan dalam bidang industri deterjen yang bermanfaat dalam mengkatalisis noda yang mengandung protein pada pakaian, selain itu dimanfaatkan dalam bidang pangan, kulit, farmasi, dan industri kimia lainnya (Li *et al.*, 2013).

Aktivitas proteolitik suatu bakteri dapat diidentifikasi pada media padat yang mengandung protein secara kualitatif melalui pengamatan pertumbuhan bakteri. Biasanya aktivitas proteolitik dihasilkan dari proses perombakan polimer protein menjadi senyawa peptida dan asam amino, yang dapat ditunjukkan dengan adanya zona bening (*halo zone*) yang terbentuk disekitar koloni pada media pertumbuhan selektif (Saidah, 2014).

Uji aktivitas protease pada penelitian ini menggunakan media selektif SMA yang mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino (Soeka & Sulistiani, 2017). Laju pembentukan asam amino dimanfaatkan sebagai pembanding bagi aktivitas katalisis protease (Oyeleke *et al.*, 2010). Katalisis enzim protease terjadi pada ikatan peptida pada protein (Ayaz, 2012). Produksi enzim protease sendiri paling banyak dihasilkan dari aktivitas mikroorganisme (Velooralappil *et al.*, 2013). Mikroorganisme lebih menguntungkan keberadaannya karena mudah dikultivasi dalam waktu yang relatif singkat dan skala yang lebih besar, kecepatan pertumbuhan relatif lebih cepat dan enzim yang dihasilkan lebih stabil. Selain itu, mikroorganisme lebih mudah direkayasa secara genetika guna mendapatkan hasil enzim yang optimum (Chi *et al.*, 2007).

Berdasarkan uraian di atas, maka tujuan penelitian ini ialah untuk menentukan aktivitas proteolitik pada enzim protease dari isolat bakteri yang diisolasi dan dikarakterisasi dari *rhizosphere* tanaman kedelai (*G. max* L.) di lahan pertanian Trenggalek, Jawa Timur.

BAHAN DAN METODE

Penelitian yang dilaksanakan merupakan penelitian jenis deskriptif kuantitatif yang dilakukan pada bulan September - Desember 2020. Sampel tanah *rhizosphere* tanaman kedelai (*G. max* L.) diambil di lahan pertanian Trenggalek, Jawa Timur. Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fisiologi Jurusan Biologi Universitas Negeri Surabaya.

Alat dan bahan yang diperlukan meliputi sampel tanah *rhizosphere* tanaman kedelai, akuades, alkohol 70%, kapas, *Skim Milk Agar* (SMA), *Skim Milk Broth* (SMB), *Nutrient Broth* (NB), 0,4 M Asam Trikloroasetat (TCA), *Buffer Fosfat*, 1 mL 0,5 M Natrium Karbonat, pepton, *yeast extract*, susu skim, kristal violet, larutan iodine, safranin, etil-alkohol 95%, NaCl, LAF (*Laminar Air Flow*), autoklaf, inkubator, *rotary shaker*, spektrofotometer, *vortex*, *soil tester*, termometer, cawan petri, jarum ose, *sput* 1mL dan 12 mL, erlenmeyer 500/ 50 mL, gelas beaker, *waterbath*, rak dan tabung reaksi, lampu spiritus dan sekop.

Sampel tanah *rhizosphere* kedelai diambil secara komposit pada lima titik dari tiga stasiun (Balai Besar Litbang Sumber Daya Lahan Pertanian, 2007). Sampel tanah *rhizosphere* diambil dengan menggunakan sekop steril pada lima titik dengan kedalaman 5-10 cm. Sampel tanah *rhizosphere* dari kelima titik dikompositkan dan diambil satu gram untuk dianalisis lebih lanjut dan disimpan pada plastik steril pada suhu 4-5°C hingga pada saat akan digunakan (Arfarita *et al.*, 2017). Masing-masing titik tanah *rhizosphere* diukur suhu dengan menggunakan termometer, dan *soil tester* untuk mengukur pH dan kelembapan tanah.

Isolasi dan enumerasi bakteri kemudian dilaksanakan dengan menggunakan metode tuang (*pour plate method*) (Waluyo, 2008). Diawali dengan pengenceran sampel (*dilution method*) dengan cara mengambil sampel tanah masing-masing satu gram dan dilarutkan ke dalam tabung reaksi berisi sembilan mililiter akuades steril, kemudian dihomogenkan dengan *vortex* dan diberi label sebagai pengenceran 10^{-1} . Satu mililiter pengenceran 10^{-1} diambil dengan menggunakan *sput* dan dimasukan

ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi sembilan mililiter akuades steril, dihomogenkan dan diberi label sebagai pengenceran 10^{-2} (langkah tersebut diulangi sampai dengan pengenceran 10^{-7}). Pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-7} masing-masing diambil satu mL dengan menggunakan *sprit* lalu dimasukkan ke dalam cawan petri, selanjutnya media SMA dituangkan secara aseptis dengan menggunakan *pour plate method*. Inkubasi dilakukan selama 24-48 jam $25-30^{\circ}\text{C}$ pada suhu ruang. Koloni bakteri yang membentuk zona bening (*halo zone*) yang telah dimurnikan kemudian disimpan sebagai stok isolat bakteri proteolitik untuk digunakan sebagai pengujian selanjutnya. Karakterisasi bakteri dilakukan terhadap bakteri yang membentuk zona bening (tujuh isolat) secara makroskopis berupa morfologi koloni yaitu elevasi, tekstur, margin, form, warna, dan diameter dan karakter mikroskopis berupa pengamatan bentuk sel dan pewarnaan gram.

Proses pewarnaan gram dilakukan dengan menggunakan *object glass* yang sebelumnya dibersihkan menggunakan alkohol dan dipanaskan di atas api lampu spiritus. Dua tetes larutan fisiologis diletakan pada *object glass* dengan menggunakan pipet tetes. Satu ose isolat bakteri proteolitik diambil dan disuspensikan secara aseptik pada larutan fisiologis, kemudian dikeringkan dan dipanaskan sedikit di atas api lampu spiritus. Larutan Kristal violet diteteskan pada isolat bakteri secara merata dan didiamkan selama satu menit, setelah itu dibilas dengan menggunakan akuades steril dan dikeringanginkan. Selanjutnya larutan iodine diteteskan pada isolat bakteri hingga merata, didiamkan selama satu menit, kemudian dibilas dengan menggunakan akuades steril dan dikeringanginkan. Alkohol 95% diteteskan pada isolat bakteri hingga merata, didiamkan selama satu menit, setelah itu dibilas dengan menggunakan akuades steril dan dikeringanginkan. Langkah terakhir dengan meneteskan larutan safranin pada isolat bakteri hingga merata dan didiamkan selama satu menit, dan dibilas dengan akuades steril dan dikeringanginkan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop (Safrida *et al.*, 2012).

Isolat bakteri *rhizosphere* diuji aktivitas proteolitiknya menggunakan media pertumbuhan selektif *Skim milk agar* (SMA), dalam waktu pembiakan bakteri pada inkubator selama 24-48 jam dengan suhu inkubasi $25-30^{\circ}\text{C}$. Indikasi hasil positif dalam menghasilkan enzim protease ditandai dengan terbentuknya zona bening (*halo zone*) disekitar pertumbuhan koloni bakteri (Ibrahim *et al.*, 2015). Rumus aktivitas bakteri proteolitik diketahui dengan indeks proteolitik (IP) berikut (Ibrahim *et al.*, 2015):

$$IP = \frac{\text{diameter zona bening}}{\text{diameter koloni bakteri}}$$

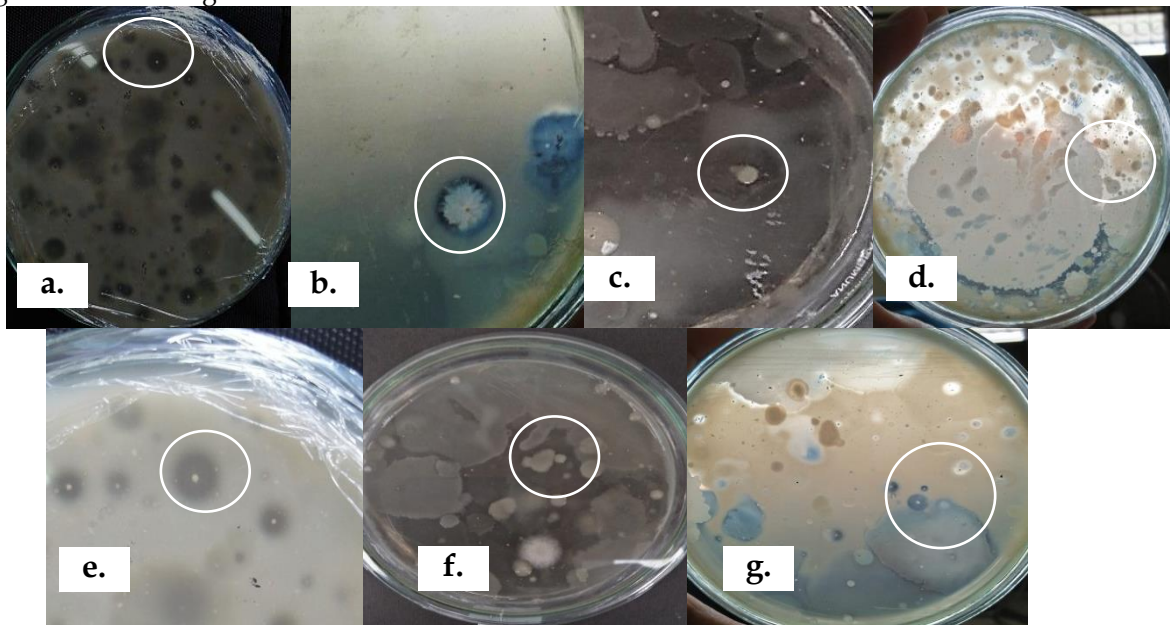
Produksi enzim protease ditandai dengan terbentuknya zona bening pada bakteri terpilih. (dengan IP, 3 besar) dalam media SMA yang telah dikarakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis. Media *Nutrient Broth* (NB) mengandung isolat bakteri dan telah diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 27°C dan kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Pengukuran *Optical Density* (OD) dilakukan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 660 \text{ nm}$. Kemudian sebanyak dua ose isolat yang diambil dari media biakan *Nutrient Broth* diinokulasi ke dalam media selektif *Skim Milk Broth* 20 mL, dan inokulan diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu ruang $25-30^{\circ}\text{C}$ selama 72 jam, kemudian pada jam ke- (0, 4, 24, 48, dan 72) kultur pada media *skim milk broth* diambil sebanyak dua mL dan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama satu menit untuk memisahkan filtrat dan ekstrak supernatan dari sel, kemudian supernatan yang diperoleh diambil untuk diukur aktivitas proteolitiknya.

Pengujian terhadap aktivitas enzim protease dilaksanakan berdasarkan pada metode yang dilakukan oleh Enggel, *et al.* (2004). Sebanyak 0,25 mL supernatan bakteri yang telah disentrifugasi ditambahkan dengan 0,25 mL larutan buffer fosfat pH 7, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 0,25 mL substrat (kasein 2% dalam buffer fosfat, pH 7), dan campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi diakhiri dengan menambahkan 0,5 mL asam trichloroasetat (TCA) 0,4 M, kemudian untuk memisahkan filtrat dan supernatannya. Sebanyak 0,2 mL supernatan ditambahkan ke 1 mL natrium karbonat 0,5 M, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Pembacaan *Optical Density* (OD) dilakukan pada panjang gelombang 660 nm.

HASIL

Dari hasil isolasi sampel tanah *rhizosphere* tanaman kedelai diperoleh tiga belas isolat bakteri diantaranya tujuh isolat mempunyai kemampuan aktivitas proteolitik (Tabel 1), dengan ditandai adanya zona bening (*halo zone*) (Gambar 1).

Hasil bakteri dari sampel tanah *rhizosphere* tanaman kedelai lahan pertanian di Trenggalek, Jawa Timur didapatkan tujuh isolat bakteri yang mempunyai kemampuan aktivitas proteolitik pada gambar dalam lingkaran.



Gambar 1. Koloni bakteri proteolitik yang diisolasi ditandai dengan terbentuknya zona bening (*halo zone*) pada media *Skim Milk Agar*.

Karakterisasi makroskopis dari ketujuh isolat bakteri *rhizosphere* yang mempunyai aktivitas proteolitik seperti terlihat pada Tabel 1. yang mana pengamatan dilakukan secara makroskopis terhadap karakteristik morfologi sel bakteri pada elevasi, tekstur, margin, form, warna dan diameter zona bening yang terbentuk.

Hasil pengamatan morfologi koloni menunjukkan bahwa elevasi (IRK1) *convex*, (IRK2, IRK5, dan IRK7) *flat*, (IRK3) *umbonate*, (IRK4) *raised*. Margin (IRK1, IRK2, IRK5, dan IRK7) *Entire*, (IRK3) *Undulate*, (IRK4) *Lobate*, dan IRK6 *Erose*. Form (IRK1, IRK7) *circullar*, (IRK2) *spindle*, (IRK3, IRK4, IRK6) *irregular*, dan (IRK5) *punctiform*. Kemudian untuk tekstur semua karakter makroskopis koloni bakteri rata-rata halus dan berwarna putih.

Tabel 1. Karakterisasi morfologi bakteri hasil isolasi dari perakaran tanaman kedelai (*G. max L.*) di Lahan pertanian Trenggalek, Jawa Timur.

No	Koloni	Karakteristik Morfologi					Diameter zona bening (mm)
		Elevasi	Tekstur	Margin	Form	Warna	
1	IRK1	<i>Convex</i>	Halus	<i>Entire</i>	<i>Circular</i>	Putih.	3,7
2	IRK2	<i>Flat</i>	Halus	<i>Entire</i>	<i>Spindle</i>	Putih.	1,3
3	IRK3	<i>Umbonate</i>	Halus	<i>Undulate</i>	<i>Irregular</i>	Putih.	0,7
4	IRK4	<i>Raised</i>	Kasar	<i>Lobate</i>	<i>Irregular</i>	Putih.	1,7
5	IRK5	<i>Flat</i>	Halus	<i>Entire</i>	<i>Punctiform</i>	Putih.	0,7
6	IRK6	<i>Umbonate</i>	Kasar	<i>Erose</i>	<i>Irregular</i>	Putih.	1,4
7	IRK7	<i>Flat</i>	Halus	<i>Entire</i>	<i>Circular</i>	Putih transparan	2,9

Pengukuran suhu, pH, dan kelembapan dilakukan pada setiap titik pengambilan sampel pada *rhizosphere* tanaman kedelai (**Tabel 2**), rata-rata suhu disetiap stasiun berkisar 30 °C, dengan pH 5 pada stasiun 1 dan 3, pH 6 pada stasiun 2, kemudian untuk kelembapan tanah pada masing-masing stasiun rata-rata berkisar 7.

Tabel 2. Hasil pengukuran rata-rata suhu, pH, kelembapan pada setiap stasiun pengambilan sampel *rhizosphere* tanaman kedelai (*G. max* L.) di lahan pertanian Trenggalek, Jawa Timur.

Stasiun	Suhu (°C)	pH	Kelembapan
1	30	5	7,3
2	29	6	7
3	29	5	7

Berdasarkan ciri-ciri makroskopis yang terdapat pada **Tabel 1**, dari ke tujuh isolat yang telah dikarakterisasi secara makroskopis kemudian dilanjutkan karakterisasi secara mikroskopis (bentuk sel dan pewarnaan gram) pada **Tabel 3**. Hasil dari pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel diperoleh data yakni semua bentuk sel bakteri basil dan masuk dalam kategori gram negatif.

Tabel 3. Karakterisasi mikroskopis tujuh isolat bakteri proteolitik dari *rhizosphere* tanaman kedelai (*G. max* L.) di lahan pertanian Trenggalek

No	Koloni Bakteri	Bentuk Sel	Gram
1	IRK1	Basil	Negatif
2	IRK2	Basil	Negatif
3	IRK3	Basil	Negatif
4	IRK4	Basil	Negatif
5	IRK5	Basil	Negatif
6	IRK6	Basil	Negatif
7	IRK7	Basil	Negatif

Berdasarkan data yang didapatkan dari ketujuh isolat bakteri proteolitik yang telah diisolasi dan karakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis kemudian dilakukan pengukuran terhadap aktivitas proteolitik pada indeks proteolitiknya. Dari tujuh isolat bakteri yang mempunyai aktivitas proteolitik dipilih tiga isolat berdasarkan pada besarnya aktivitas proteolitik berupa zona bening (*halo zone*) yang terbentuk, serta kemampuan pertumbuhan bakteri yang baik dan eksponensial (Tabel 1). Hasil yang diperoleh berupa indeks proteolitik terdapat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Aktivitas indeks bakteri proteolitik dalam waktu inkubasi 48 jam

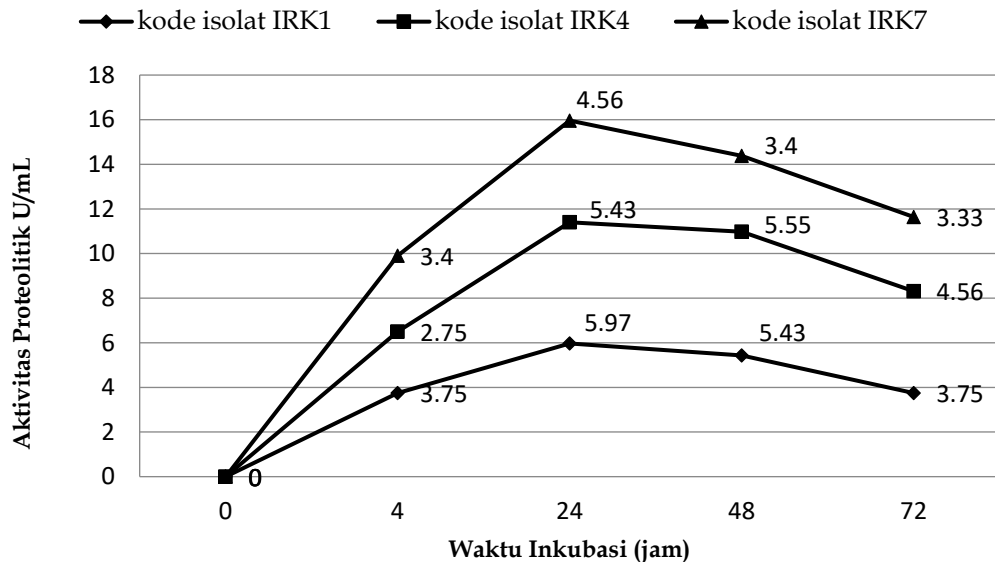
No	Kode koloni	Zona bening-diameter koloni	IP
1	IRK1	3,7	2,54
2	IRK4	1,7	1,77
3	IRK7	2,9	1,80

Keterangan: IP = Indeks Proteolitik

Hasil pengujian aktivitas proteolitik enzim protease setiap isolat bakteri menunjukkan bahwa bakteri dengan waktu inkubasi 24 jam rata-rata menghasilkan aktivitas proteolitik enzim protease paling optimal, pada kode isolat bakteri IRK1 sebesar 5,97 U/mL, IRK4 5,43U/ML, dan IRK7 4,56 U/mL (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut aktif dalam menghasilkan enzim protease.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pada Tabel 1 dan Gambar 1, didapatkan isolat bakteri proteolitik sebanyak tujuh dari total tiga belas isolat pada sampel tanah *rhizosphere* tanaman kedelai yang diperoleh dari lahan pertanian di Trenggalek Jawa Timur. Faktor lingkungan dapat mempengaruhi keberadaan pertumbuhan bakteri terhadap jumlah dan jenis dari bakteri proteolitik, seperti pH, suhu, dan kelembapan tanah (Tabel 2). Faktor yang paling penting bagi pertumbuhan bakteri salah satunya adalah pH tanah yang dapat menentukan kelimpahan bakteri proteolitik. Semakin rendah pH suatu tanah maka kelimpahan bakteri proteolitik juga semakin rendah (Zheng *et al.*, 2019). pH optimum bagi pertumbuhan suatu bakteri proteolitik berkisar pada rentang 5-7 yang berkaitan dengan aktivitas enzim dalam proses katalisis reaksi-reaksi pertumbuhan, apabila pH tidak optimal maka reaksi kerja enzim yang dihasilkan dapat mempengaruhi laju pertumbuhan pada bakteri tersebut (Suparnorampius *et al.*, 2020). Berdasarkan data yang diperoleh dari ketiga stasiun pengambilan sampel masing-masing pH berkisar 5 sampai 6, hal ini sudah sesuai dengan pH optimum untuk pertumbuhan suatu bakteri. Selain pH, populasi pertumbuhan bakteri proteolitik juga dipengaruhi



Gambar 2. Uji aktivitas enzim protease bakteri terpilih yang diinkubasi pada media *Skim milk broth* selama 72 jam.

oleh kelembapan dan suhu tanah yang dipengaruhi oleh adanya iklim yang akan berdampak terhadap sifat fisiologis tanah sehingga populasi dan keanekaragaman mikrobia di tanah semakin melimpah (Widyati, 2013). Suhu juga berdampak pada pertumbuhan dan perkembangan bakteri, utamanya pada kinerja enzimatis (Sanita *et al.*, 2013; Dewanti *et al.*, 2017). Menurut Sari *et al.*, (2011), kecepatan pertumbuhan mikroba meningkat lambat pada kisaran suhu 30°C dengan naiknya suhu sampai kecepatan pertumbuhan maksimum. Kemudian pada kecepatan kisaran di atas suhu maksimal, laju pertumbuhan mikroba dapat turun cepat dengan ditandai kenaikan suhu pada saat masa inkubasi.

Tujuh isolat bakteri kemudian dilanjutkan pada uji biokimia, yang meliputi pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel (Tabel 3), dengan didapatkan hasil pada semua isolat koloni bakteri berbentuk basil dan termasuk dalam bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif ini pada umumnya terdapat dinding sel yang memiliki kadar lipida cukup tinggi. Lipida dapat dilarutkan dengan menggunakan aseton alkohol hingga zat warna kompleks pada kristal violet yang terdapat di dinding sel akan luruh dan kemudian zat warna safranin akan diikat pada saat pewarnaan sehingga warna bakteri akan nampak merah pada saat pengamatan dengan mikroskop. Dinding sel pada bakteri gram positif memiliki peptidoglikan yang tidak mampu larut pada penggunaan aseton alkohol sehingga zat warna biru kompleks pada kristal violet akan tetap dipertahankan pada saat proses pewarnaan (Campbell *et al.*, 2003).

Pewarnaan gram memiliki zat warna yang bersifat asam dan basa. Warna basa terdapat pada bagian kromofor yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan muatan positif, sedangkan muatan negatif dalam memberikan warna terdapat pada zat warna asam. Zat warna basa pada umumnya lebih sering digunakan dibandingkan dengan zat warna asam, hal ini dikarenakan muatan negatif yang ditemukan pada dinding sel, sitoplasma, dan membran sel lebih banyak. Kaitan antara muatan positif zat warna basa dan muatan negatif zat warna asam dalam sel pada saat proses pewarnaan berpengaruh terhadap hasil pengamatan mikroorganisme yang akan nampak jelas terlihat (Dwijoseputro, 2005).

Hasil uji aktivitas proteolitik diperoleh tiga isolat (Tabel 4) yang memiliki diameter zona bening (*halo zone*) terbesar dengan menunjukkan bahwa perombakan protein menjadi asam amino terjadi dengan memiliki sifat terlarut pada media pertumbuhan selektif serta pertumbuhan bakteri yang baik dan eksponensial (Irena, 2010). Selanjutnya pengujian dilakukan terhadap aktivitas enzim protease guna mengetahui besar aktivitas proteolitik yang ditunjukkan dari nilai hasil yang paling tinggi diperoleh pada nilai indeks proteolitik (IP). Adanya indeks proteolitik merupakan gambaran perbandingan dari besarnya diameter koloni bakteri dengan besarnya zona bening disekitar koloni yang terbentuk (Sastono *et al.*, 2008).

Hasil pengujian terhadap aktivitas enzim protease pada isolat bakteri *rhizosphere* tanaman kedelai yang diinkubasi pada media selektif *Skim Milk Broth* (SMB) bertujuan untuk mengetahui

waktu terbaik produksi enzim protease. Hasil pengujian terhadap aktivitas protease dengan menggunakan spektrofotometer (Gambar 2), menunjukkan bahwa terdapat aktivitas protease tertinggi pada isolat IRK1, IRK4 dan IRK7 pada jam ke-24 masa inkubasi berturut-turut sebesar 5,97 U/mL, 5,43 U/mL, dan 4,56 U/mL. Meningkatnya aktivitas protease disebabkan karena tingginya aktivitas metabolisme dalam melakukan pembelahan sel dan sintesis enzim. Apabila pertumbuhan sel bakteri meningkat maka sekresi enzim yang dihasilkan semakin banyak sehingga aktivitas protease akan meningkat. Berdasarkan pernyataan yang disampaikan oleh Das *et al.*, (2013), bahwa sekresi enzim tergantung pada jumlah sel dan fase pertumbuhan pada mikroorganisme spesifik (Ire *et al.*, 2011).

Pada Gambar 2, tiga isolat terpilih yang diinkubasi selama 72 jam menunjukkan profil kurva pertumbuhan isolat bakteri yaitu pada inkubasi jam ke-0 belum tampak adanya kemampuan bakteri dalam beradaptasi terhadap lingkungan yang baru (Rolfe *et al.*, 2012), fase lag sendiri merupakan fase pertama dalam pertumbuhan mikroorganisme pada umumnya. Pada fase ini, sel akan aktif secara biokimia namun tidak aktif membelah (Patil, 2006).

Fase eksponensial dari aktivitas protease isolat bakteri *rhizosphere* kedelai terjadi pada masa inkubasi 0 jam sampai dengan 24 jam (Gambar 2), pada masa inkubasi 24 jam isolat bakteri IRK1, IRK4 dan IRK7 mempunyai aktivitas enzim protease tertinggi secara berturut-turut yaitu 5,97 U/mL, 5,43 U/mL, dan 4,56 U/mL. Hal ini dikarenakan nutrisi yang tersedia cukup memungkinkan sel untuk melakukan pembelahan sehingga mengakibatkan jumlah sel meningkat secara cepat, pada fase ini mikroba juga banyak memproduksi metabolit primer (Sanchez & Demain, 2008). Metabolit primer merupakan produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah yang dihasilkan pada fase eksponensial, sehingga dibutuhkan untuk pertumbuhan setiap mikroba salah satunya adalah enzim protease (Sunarminingsih, 2002). Fase eksponensial adalah fase yang paling sesuai bagi pertumbuhan mikroba dikarenakan aktivitas metabolit berlangsung secara aktif dan optimum sehingga mampu mensintesis bahan dengan cepat dalam jumlah yang konstan (Purkan *et al.*, 2014).

Pertumbuhan bakteri pada masa inkubasi 48 jam hingga 72 jam terjadi fase stasioner dengan ditunjukkan adanya jumlah pada sel bakteri yang hidup relatif seimbang terhadap jumlah sel bakteri yang mati. Metabolisme aktivitas bakteri proteolitik semakin melambat yang disebabkan oleh jumlah nutrisi yang disediakan dalam media pertumbuhan semakin terbatas. Selain itu adanya akumulasi produk buangan dari hasil metabolisme yang bersifat toksik bagi sel dapat pula menyebabkan terhambatnya pertumbuhan pada sel bakteri (Pepper *et al.*, 2015). Enzim ekstraseluler disintesis oleh adanya mikroorganisme pada fase eksponensial sampai dengan fase stasioner mengikuti pola kurva pertumbuhan, berdasarkan pernyataan Qadar (2009) dan Kumara *et al.*, (2012) yang mengemukakan bahwasanya produksi enzim protease optimal dapat dicapai pada fase akhir eksponensial atau fase awal stasioner.

Setelah inkubasi 48 jam terjadi penurunan aktivitas protease secara bertahap sampai dengan jam ke-72 dengan diperoleh nilai aktivitas protease pada isolat berturut-turut (IRK1, IRK4, dan IRK7) sebesar 3,75 U/mL, 4,56 U/mL, dan 3,33 U/mL. Penurunan aktivitas protease tersebut disebabkan karena tidak tersedianya nutrisi dan substrat yang cukup dalam masa produksi inkubasi (Srividya, 2011). Ketersediaan nutrisi dan substrat yang menipis menyebabkan jumlah enzim yang disekresi akan menurun, sehingga aktivitas protease akan terjadi seiring dengan autolisis sel akibat adanya akumulasi berbagai enzim dalam media pertumbuhan (Olajuyigbe, 2013). Selain itu, apabila terlalu lama dibiarkan dalam media pertumbuhan akan menjadi tidak stabil (Rabelo *et al.*, 2011). Penghambatan pada proses pembentukan kompleks enzim substrat dipengaruhi juga oleh perubahan bentuk pada sisi aktif enzim dan struktur enzim, sehingga dapat mengakibatkan tidak mampu dimanfaatkannya dengan baik dalam proses pengikatan substrat yang terdapat pada media pertumbuhan (Pakpahan, 2009). Sehingga dapat diketahui bahwa masa inkubasi ke-24 jam merupakan masa inkubasi optimum untuk ekstraksi enzim protease pada aktivitas proteolitik.

SIMPULAN

Penelitian yang dilakukan telah berhasil mengisolasi sebanyak tujuh isolat bakteri yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan aktivitas proteolitik dengan ditandai terbentuknya zona bening (*halo zone*) disekitar koloni bakteri, karakterisasi bakteri secara makroskopis dan mikroskopis dihasilkan karakter bakteri dengan hasil gram negatif dan berbentuk basil. Tiga isolat terpilih dengan zona bening terbesar dilakukan uji terhadap indeks proteolitik pada isolat IRK1 sebesar 2,54; IRK4 sebesar 1,77 dan IRK7 sebesar 1,80. Aktivitas enzim protease dari ketiga isolat IRK1, IRK4, dan IRK7 secara berurutan diperoleh hasil eksponensial pada masa inkubasi 24 jam sebesar 5,97 U/mL, 5,43 U/mL, dan 4,56 U/mL. Sehingga dapat diketahui bahwa pada masa inkubasi jam ke-24 nutrisi yang

tersedia cukup memungkinkan sel untuk melakukan pembelahan dan mengakibatkan jumlah sel meningkat secara cepat, pada fase ini mikroba juga banyak memproduksi metabolit primer salah satunya pada enzim protease.

DAFTAR PUSTAKA

- Arfarita N, Lestari MW, Murwani I and Higuchi T, 2017. Isolation of Indigenous Bacteria of *Phosphate Solubilizing* from Green Bean *Rhizospheres*. *Journal of Degraded and Mining Lands Management* Vol 4 (3): 845.
- Astuti PR, 2008. *Rizobakteria Bacillus sp. Asal Tanah Rizosfer Kedelai yang Berpotensi sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman*. (Tesis) Sekolah Pasca Sarjana IPB Bogor: Badan Pusat Statistik Press.
- Ayaz NO, 2012. Formation of Proteases from Newly Isolated Strain Isolated from Saudi Arabia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol 2 (8): 19.
- Balai Besar Litbang Sumber Daya Lahan Pertanian, 2007. *Metode Analisis Biologi Tanah* : Bogor.
- Cahyadi W, 2006. *Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Makanan*. Jakarta: PT Bumi Askara.
- Campbell, Neil A, Reece, Jane B and Mitchell LG, 2003. *Biologi* (5th ed.). Jakarta: Erlangga.
- Chi Z, Ma C, Wang P and Li HF, 2007. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Alkaline Protease Production by the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology* Vol 98(3): 534–538.
- Chutmanop J, Chuiculcherm S, Chisti Y and Srinopakun P, 2008. Protease Production by *Aspergillus oryzae* in Solid-state Fermentation using Agroindustrial Substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol* Vol 83 :1012-1018.
- Das A, Paul T, Halder SK, Maity C, Mohapatra PK, Pati BR and Mondal KC, 2013. Study on Regulation of Growth and Biosynthesis of Cellulolytic Enzymes from Newly Isolated *Aspergillus fumigatus* ABK9. *Polish Journal of Microbiology* Vol 62 (1): 31–43.
- Dewanti A W, Pratiwi E dan Nuraini Y, 2017. Viabilitas Dan Aktivitas Enzim Fosfatase Serta Produksi Asam Organik Bakteri Pelarut Fosfat Pada Beberapa Suhu Simpan. *Jurnal Tanah Dan Sumberdaya Lahan* Vol 3(1): 311–318.
- Dwijoseputro D, 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, cetakan ke 16. Jakarta: Djembatan
- Enggel J, Meriandini A dan Natalia L, 2004. Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* Vol 9(1): 9–12.
- Ferfinia A, 2010. *Eksplorasi Bakteri dan Cendawan Rizosfer yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Basah pada Batang Pepaya (Carica papaya L.) Di Pasir Kuda, Desa Ciomas. Bogor. Skripsi. Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian. IPB, Bogor (Publikasi)*.
- Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, Elbadawi YB, El-Tayeb MA, and Ibrahim SSS, 2015. Production of Extracellular Alkaline Protease by New Halotolerant Alkaliphilic *Bacillus sp.* NPST-AK15 Isolated from Hyper Saline Soda Lakes. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol 18(3): 236–243.
- Ire FS, Okolo BN, Moneke AN and Odibo FJC, 2011. Influence of Cultivation Conditions On the Production of a Protease from *Aspergillus carbonarius* Using Submerged Fermentation. *African Journal of Food Science* Vol 5(6): 353–365.
- Irena A, 2010. *Isolasi dan Optimasi Protease Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung*. *Unpublished Thesis*. Bogor: Departemen Biokimia FMIPA IPB.
- Kumara M, Kashyap SSN, Vijay R, Tiwari R and Anuradha M, 2012. Production and Optimization of Extra Cellular Protease from *Bacillus sp.* Isolated from Soil. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* Vol 3(2): 564–569.
- Li Q, Yi L, Marek P and Iverson BL, 2013. Commercial Proteases: Present and Future. *FEBS Letters* Vol 587(8): 1155–1163.
- Olajuyigbe FM, 2013. Optimized Production and Properties of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* SHS-04 Grown on Groundnut (*Arachis hypogaea*) Meal. *Advances in Enzyme Research* Vol 1(04): 112.
- Oyeleke SB, Egwim EC and Auta SH, 2010. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for Extracellular Protease Enzyme Production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* Vol 2(7): 83–87.
- Patil U, Chaudhari AB, Kulkarni JS and Chincholkar SB, 2008. *Foundations in Microbiology*. India : Rachana Enterprises.
- Pakpahan R, 2009. *Thermophilic Bacteria Isolation and Protease Activity Test from Sipoholon Tapanuli Hot Spring*. North Sumatra :USU Medan.
- Pepper IL, Gerba CP and Gentry TJ, 2015. Introduction to Environmental Microbiology. In *Environmental Microbiology* (pp. 3–8). USA: Elsevier.
- Purkan P, Baktir A, and Sumarsih S, 2014. Exploration of Chitinolytic Bacteria from Organic Waste: Isolation and Characterization of Chitinase Enzymes. *Moleculer* Vol 9(2): 128–135.
- Qadar SAU, Shireen E, Iqbal S and Anwar A, 2009. Optimization of Protease Production from Newly Isolated Strain of *Bacillus sp.* PCSIR EA-3. *Indian Journal Biotechnology* Vol 8(3): 286–290.
- Rabelo MC, Fontes CML, and Rodrigues S, 2011. Stability Study of Crude Dextranase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742. *Indian Journal of Microbiology* Vol 51(2): 164–170.
- Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron ADS, Alston M, Stringer MF, Betts RP and Baranyi J, 2012. Lag Phase is a Distinct Growth Phase that Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology* Vol 194(3): 686–701.
- Safrida YD, Yulvizar C dan Devira CN, 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Berpotensi Probiotik pada Ikan

- Kembung (*Rastrelliger sp.*). *DEPIK Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir Dan Perikanan Vol 1(3)*.
- Saidah AN, 2014. *Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Penguji Aktivitas Enzim Protease. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.*
- Sanchez S and Demain AL, 2008. *Metabolic Regulation and Overproduction of Primary Metabolites. Microb Biotechnol Vol 1: 283–319.*
- Sanita S dan Soemarno S, 2013. Pengaruh Suhu dan pH terhadap Laju Pertumbuhan Lima Isolat Bakteri Anggota Genus *Pseudomonas* yang Diisolasi dari Ekosistem Sungai Tercemar Deterjen di Sekitar Kampus Universitas Brawijaya. *J-PAL Vol 3(2): 58–62.*
- Sari NA, Fauziah RN dan Nurbaety AT, 2011. Pengaruh Suhu dan Salinitas Terhadap Viabilitas Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Bacillus sp.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Santoso A, Yossi W dan Anang S, 2008. Extraction of Protease Enzymes from Ginger for Meat Mixing Process. Jember : Politeknik Negeri Jember Press.
- Soeka YS, dan Sulistiani S, 2017. Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Stenotrophomonas sp.* Asal Gunung Bromo Jawa Timur : *Berita Biologi Vol 16(2): 203–211.*
- Srividya S, 2011. Pengaruh Parameter Proses pada Produksi Protease Alkali yang Kompatibel dengan Deterjen oleh *Bacillus sp.* yang Baru Diisolasi. *Y. Jurnal Biologi Vol 35 (2): 177–182.*
- Suhardi D, 2002. Hutan dan Kebun sebagai Penghasil pangan Nasional. *Yogyakarta Kanisius.*
- Suparnorampius S, Pata'dungan YS and Rois R, 2020. Exploration of Phosphate Solubilizing Bacteria in Various Industrial and Horticultural Plants in the Napu Highlands. *Agrotechbists: E-Journal of Agricultural Sciences Vol 8 (1): 25–31.*
- Sunarminingsih R, 2002. Metabolit Sekunder : Manfaat dan Perkembangannya dalam Dunia Farmasi. Yogyakarta : UGM.
- Velooralappil NJ, Robinson BS, Selvanesan P, Sasidharan S, Kizhakkepawothail NU, Sreedharan S, Prakasan P, Moolakkariyil S and Sailas B, 2013. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research, 2013.*
- Waluyo L, 2008. Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Widayanti, 2007. Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus sp. Indigenus* Penghasil Asam Indol Asetat Asal Tanah Rhizosphere. *Institut Pertanian Bogor.*
- Widyati E, 2013. Pentingnya Keragaman Fungsional Organisme Tanah terhadap Produktivitas Lahan. *Tekno Hutan Tanaman Vol 6 (1): 29–37.*
- Zheng BX, Zhang, DP, WangY, Hao XL, Wadaan MAM, Hozzein WN, Penuelas J, Zhu YG and Yang XR, 2019. Responses to Soil pH Gradients of Inorganic Phosphate Solubilizing Bacteria Community. *Scientific Reports Vol 9 (1): 1–8.*

Available Online: 30 November 2021

Published: 31 Januari 2022

Authors:

Nur Fitriana, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang, Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, 60231, Indonesia, e-mail: nur.17030244038@mhs.unesa.ac.id
Mahanani Tri Asri, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang, Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, 60231, Indonesia, e-mail: mahananitria@gmail.com

How to cite this article:

Fitriana N, Asri MT, 2022. Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri *Rizosphere* Tanaman Kedelai (*Glycine max L.*) di Trenggalek. *LenteraBio; 11(1): 144-152*