

Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Protease Asal Sumber Air Panas Way Belerang, Lampung

Isolation and Characterization Morphology of Thermophilic Bacteria Producing Protease Enzymes from Way Belerang Hot Springs, Lampung

Aulia Putri¹, Erma Suryanti^{1*}, Meezan Ardhanu Asagabaldan²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sumatera, Lampung, Indonesia

²Program Studi Sains Lingkungan Kelautan, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sumatera, Lampung, Indonesia

*corresponding author, Email: erma.suryanti@bi.itera.ac.id

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 04/06/2025

Disetujui : 26/09/2025

Abstract

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds in proteins and are widely applied in the food, agricultural, and medical industries. The discovery of thermostable proteases from thermophilic bacteria is of particular interest due to their stability and activity at elevated temperatures. Thermophilic bacteria, capable of growing optimally at 50–65°C, can be isolated from geothermal environments such as the Way Belerang Hot Springs in Kalianda, South Lampung. This study aimed to isolate and characterize thermophilic, protease-producing bacteria from the Way Belerang Hot Springs and to evaluate their protease activity both qualitatively and quantitatively. Thermophilic bacterial isolates were obtained from water and sediment samples. Screening for protease activity was conducted via qualitative assays on skim milk agar, followed by macroscopic and microscopic characterization of selected isolates. Growth curves were established, and protease activity was measured quantitatively using casein as a substrate. A total of 26 thermophilic bacterial isolates were obtained. The Qualitative analysis identified 11 from 26 isolates exhibiting proteolytic activity under testing at 53 °C and on NA medium supplemented with 1% skim milk powder. Quantitative protease activity was measured at 0.0204 U/mL at 53 °C. Morphological characterization showed that the A9.5 isolate is a Gram-positive bacterium. The thermophilic bacterium A5.9 has potential as a protease enzyme producer and requires further characterization of its activity under varying pH and temperature conditions to determine the optimum enzyme activity for industrial applications requiring thermostable enzymes.

Key Words : Protease enzymes, thermophilic bacteria

Abstrak

Protease merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Enzim ini biasa dimanfaatkan dalam industri pangan, pertanian, medis hingga membantu dalam proses pencernaan. Pencarian enzim protease dari bakteri diperlukan terutama bakteri yang memiliki ketahanan terhadap suhu tinggi, seperti bakteri termofilik. Bakteri termofilik dapat hidup pada suhu di atas 45°C dan dapat hidup optimal pada suhu antara 50°C-65°C. Bakteri termofilik dapat diperoleh salah satunya dari Sumber Air Panas Way Belerang yang terletak di Kalianda, Lampung Selatan. Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengisolasi bakteri termofilik asal Sumber Air Panas Way Belerang, mengkarakterisasi bakteri termofilik penghasil enzim protease, serta menguji aktivitas enzim protease secara kualitatif dan kuantitatif dari bakteri termofilik asal pemandian air panas Way Belerang. Metode penelitian ini terdiri atas isolasi sampel bakteri dari sedimen dan air dari Way Belerang, uji kualitatif enzim protease bakteri termofilik, karakterisasi makroskopik dan mikroskopik bakteri penghasil enzim protease, kurva pertumbuhan bakteri, pengujian aktivitas enzim protease secara kuantitatif, serta analisis data. Hasil penelitian diperoleh 26 isolat bakteri hasil isolasi dari Sumber Air Panas Way Belerang yang diperoleh dari sampel air dan sedimen. Isolat tersebut diujikan aktivitas protease secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif diperoleh 11 dari 26 isolat yang terdapat aktivitas proteolitik pada pengujian di suhu 53 oC dan pada media NA + 1 % skim milk powder. Isolat S5.1 memiliki Indeks proteolitik tertinggi sebesar 3.59 yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media media NA + 1 % skim milk powder. Aktivitas protease secara kuantitatif sebesar 0.0204 unit/ml pada suhu 53 oC Karakterisasi morfologi menunjukkan bakteri A9.5 adalah Gram positif. Bakteri termofilik S5.1 berpotensi sebagai penghasil enzim protease dan perlu dikarakterisasi lebih lanjut aktivitasnya dengan variasi pH dan suhu untuk mendapatkan aktivitas enzim yang optimal untuk aplikasi industri yang memerlukan enzim termostabil.

Kata kunci : Bakteri termofilik, enzim protease, Sumber air panas Way Belerang

PENDAHULUAN

Enzim dikenal sebagai biokatalisator yang memiliki fungsi sebagai katalis dalam berbagai reaksi kimia di dalam tubuh (Awaludin Prihanto *et al.*, 2018). Menurut Putra *et al* (2021), enzim akan mempercepat laju reaksi sebesar 10^8 hingga 10^{11} lebih cepat jika dibandingkan dengan reaksi yang tidak menggunakan enzim sebagai katalis. Enzim tidak hanya berperan sebagai biokatalisator, namun enzim juga dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan komersial, seperti di bidang industri, kimia, produk pertanian hingga medis (Rahmianti *et al.*, 2016). Menurut Jayanti (2022), salah satu kelompok enzim yang berperan penting dalam industri, seperti industri makanan, farmasi, dan hidrolisis protein adalah enzim protease.

Protease merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein (Rahmawati *et al.*, 2021). Enzim ini biasa dimanfaatkan dalam pembuatan keju, bir, baking, serta membantu dalam proses pencernaan. Menurut Susanti *et al* (2017), protease adalah tergolong kedalam tiga kelompok besar enzim industri dengan total penjualan di seluruh dunia mencapai 59% dari enzim lain. Enzim ini dapat diproduksi dari hewan atau tumbuhan. Namun, waktu yang diperlukan relatif lama dan enzim yang diperoleh tidak dalam jumlah besar sehingga diperlukan alternatif lain, salah satunya adalah penggunaan mikroorganisme dalam produksi enzim, seperti bakteri. Hal ini terjadi karena bakteri memiliki pertumbuhan yang cepat, mudah untuk ditumbuhkan pada media kultur, dan dapat diproduksi dalam skala besar Jayanti (2022). Salah satu bakteri yang sering digunakan dalam produksi enzim adalah bakteri termofilik.

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang dapat hidup pada suhu diatas 45°C dan dapat hidup optimal pada suhu antara 50°C - 65°C . Bakteri ini dapat hidup di suhu tinggi karena memiliki protein yang tahan terhadap panas dan denaturasi (Mawati *et al.*, 2021). Penggunaan bakteri termofilik sebagai penghasil enzim protease memiliki keunggulan seperti aktivitas enzim yang tetap stabil dalam proses industri yang memerlukan suhu tinggi tanpa kehilangan aktivitasnya. Salah satu habitat yang cocok untuk bakteri termofilik hidup adalah sumber air panas. Penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan (2017) pada Sumber Air Panas Semurup Jambi memperoleh 120 isolat bakteri termofilik dengan 50 isolat di antaranya dapat menghasilkan enzim protease termostabil. Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan eksplorasi bakteri-bakteri penghasil enzim protease dari alam, salah satunya dari Sumber Air Panas Way Belerang.

Penelitian mengenai bakteri termofilik asal Sumber Air Panas Way Belerang sudah dilakukan oleh Mawati *et al* (2021). Penelitian tersebut menyebutkan bahwa isolat bakteri termofilik asal Sumber Air Panas Way Belerang memiliki aktivitas amilolitik. Penelitian mengenai bakteri termofilik

penghasil enzim protease di Sumber Air Panas Way Belerang belum pernah dilakukan. Menurut Mawati *et al* (2021), Sumber Air Panas Way Belerang memiliki suhu berkisar antara 45° - 65°C yang memungkinkan untuk bakteri termofilik dapat hidup. Berdasarkan latar belakang berikut maka perlu dilakukan penelitian mengenai bakteri termofilik penghasil enzim protease asal Sumber Air Panas Way Belerang. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofilik penghasil enzim protease asal Sumber Air Panas Way Belerang secara kualitatif dan kuantitatif.

MATERI DAN METODE

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel air dari Sumber Air Panas Way Belerang Kalianda dilakukan secara *purposive sampling*. Sampel yang diambil diukur terlebih dahulu suhu dan pH kemudian dimasukan kedalam botol steril 100 ml pada kedalaman 10 cm dari permukaan air lalu disimpan di dalam boks. Sampel sedimen diambil sebanyak 100 g yang diambil dari dasar sumber air panas menggunakan sendok steril lalu ditempatkan dalam kantong plastik steril. Kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi untuk diuji lebih lanjut.

Isolasi dan Pemurnian Bakteri Temofilik

Sampel diisolasi dengan memasukkan sebanyak 1 ml sampel air atau 1 g sampel sedimen kedalam 9 ml aquades steril. Sebelum diencerkan, sampel dipanaskan dahulu menggunakan suhu 53°C dan 90°C selama 1 menit. Pemanasan ini menggunakan metode (Yassin *et al.*, 2021), yang telah dimodifikasi. Setelah itu, sampel diencerkan secara bertingkat menggunakan aquades steril hingga pengenceran 10^{-7} . Kemudian diambil sebanyak 0,1 ml dari pengenceran 10^{-6} dan 10^{-7} sampel air ataupun sampel sedimen lalu dituang kedalam media NA dan diratakan menggunakan batang pengaduk (*spreader*). Isolasi sampel dilakukan secara duplo dan diinkubasi pada suhu 53°C selama 24 jam. Pemurnian dilakukan dengan metode kuadran. Hasil pemurnian diinkubasi pada suhu 53°C selama 24 jam (Fachrial *et al.*, 2021).

Uji Kualitatif Aktivitas Proteolitik

Pengujian ini dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri termofilik pada medium 1 % *Skim Milk Agar* (SMA). Kemudian, inkubasi pada suhu 53°C selama 48 jam. Aktivitas protease ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni (Jayanti, 2022). Selanjutnya ditentukan Indeks Proteolitik (IP):

$$IP = \frac{\text{Diameter zona bening (mm)} - \text{Diameter koloni (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}}$$

Karakterisasi Morfologi Bakteri

Karakterisasi morfologi bakteri meliputi pengamatan morfologi koloni bakteri dan morfologi sel bakteri. Morfologi koloni bakteri dilakukan dengan mengamati permukaan koloni bakteri, bentuk koloni bakteri dan tepi koloni bakteri yang mengacu pada Hadioetomo (1993). Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan preparasi sampel bakteri pada kaca preparat yang kemudian dilakukan pewarnaan Gram menggunakan pewarna kristal violet dan safranin (Coico 2006). Hasil pewarnaan Gram diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000kali.

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri dimulai dengan pembuatan inokulum pada media *Natrium broth* yang ditambahkan 1% *skim milk powder* kemudian dilanjutkan dengan proses produksi enzim. Inokulum yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 53°C; 100 rpm, diambil sebanyak 5% untuk diinokulasikan ke dalam 100 mL medium produksi. Sampling dilakukan setiap 2-3 jam sekali selama 24 jam untuk pengukuran pertumbuhan mikroba yang dikenal dengan pengukuran OD (*optical density*) pada panjang gelombang 600 nm serta sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Supernatan diambil dan dianalisis aktivitas protease (Rahayu, 2014).

Pengujian Aktivitas Enzim Protease Secara Kuantitatif

Prosedur untuk mengukur aktivitas enzim proteolitik adalah metode Walter (1984) yang telah dimodifikasi. Terdapat tiga perlakuan yaitu blanko, standar dan sampel. Sebanyak 50 µl larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 250 µl kasein 1% (0.25 g kasein dalam 25 ml buffer fosfat 0.05 M). Perlakuan pada blanko dan standar, enzim diganti dengan buffer fosfat 0.1 M dan tirosin 0,1 mM. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 53°C selama 10 menit. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan cara penambahan 1 mL TCA (*Trichloroacetic acid*) 0,1 M. Selanjutnya larutan diinkubasi kembali pada suhu 53°C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 375 µl supernatan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1.250 µl Na₂CO₃ 0,4 M kemudian ditambahkan 250 µl pereaksi *folin Ciocalteau* yang sudah diencerkan dengan aquades steril dengan perbandingan 1:2 dan diinkubasi pada suhu 53°C selama 30 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm

Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dan statistika dengan bantuan Microsoft Excel. Data yang diperoleh yaitu aktivitas kualitatif protease, kurva pertumbuhan bakteri, aktivitas kuantitatif enzim protease, dan karakteristik morfologi bakteri termofilik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Uji Kualitatif Aktivitas Proteolitik

Sampel yang diambil dari Pemandian Air Panas Way Belerang terdiri atas sampel air dan sedimen yang diambil dari 3 titik berbeda. Pengukuran suhu dan pH dilakukan pada masing masing titik pengambilan sampel. Suhu rata-rata pada setiap titik berkisar 51°-54°C dengan pH berkisar 2,2-2,4 (Tabel 1). Suhu dan pH Sumber Air Panas Way Belereng menunjukkan bahwa kondisi lingkungan tersebut termasuk habitat yang baik bagi bakteri termofilik. Penelitian yang dilakukan oleh Tuntun & Huda (2014) di Sumber Air Panas Natar yang memiliki suhu berkisar antara 45°-60°C dengan pH 7 dan penelitian yang dilakukan oleh Nanda *et al* (2017), di Sumber Air Panas Sungai Tutung dengan suhu 65°-70°C dan pH 8 juga menunjukkan bahwa bakteri termofilik hidup dengan suhu lingkungan diatas 45°C.

Tabel 1. Hasil pengukuran suhu dan pH pada setiap stasiun pengambilan sampel

Stasiun	Suhu (°C)	pH
1	52	2.2
2	51	2.4
3	54	2.3

Hasil isolasi dari sampel diperoleh isolat bakteri sebanyak 26 isolat. Isolat tersebut kemudian dilakukan pengujian aktivitas proteolitik secara kualitatif menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). Hasil uji kualitatif aktivitas proteolitik diperoleh sebanyak 11 isolat penghasil protease (Tabel 2). Isolat memiliki aktivitas proteolitik ditandai dengan munculnya zona bening disekitar koloni bakteri pada media *Skim Milk Agar* (SMA) (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil uji kualitatif aktivitas proteolitik pada sampel A9.5 dan A9.6

Zona bening pada media SMA terjadi karena terjadi pemecahan molekul protein oleh koloni bakteri (Simamora & Sukmawati, 2020). Susu skim termasuk kandungan yang terdapat pada media Media SMA. Susu skim mengandung kasein yang berfungsi sebagai substrat enzim. Menurut Pakpahan (2009) dalam Manik & Simajuntak (2020), kasein merupakan salah satu protein susu ang terdiri atas fosfoprotein yang akan berikatan dengan kalsium

Tabel 2. Hasil uji aktivitas kualitatif proteolitik

Kode Isolat	Diameter Rata-Rata (mm)		Indeks Proteolitik (IP)
	Koloni	Zona Bening	
S5.1	1.6	7.05	3.59
A9.3	1.27	4.9	2.86
A9.4	1.95	2.95	0.51
A9.5	5.6	25.75	3.41
A9.6	2.5	3.25	0.3
A9.7	1.57	2.7	0.72
A9.8	0.8	1.5	0.87
S9.9	5.9	13.25	1.24
S9.10	2.37	5.25	1.21
S5.11	1.65	3.8	1.3
S5.12	1.17	2.17	0.85

dan membentuk garam kalsium yang disebut dengan kalseinat. Menurut Yuniati *et al* 2015), kandungan protein pada media SMA akan dihidrolisis oleh enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri sehingga terbentuk zona bening. Enzim protease bakteri akan mengkatalisis proses degradasi protein dengan cara memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air kedalam molekul. Reaksi tersebut akan melepaskan asam amino (Cahyaningrum *et al.*, 2021)

Uji kualitatif aktivitas proteolitik (Tabel 1) menunjukkan isolat A9.5 memiliki aktivitas proteolitik terbesar, yaitu sebesar 3.59. Indeks proteolitik (IP) isolat A9.5 tergolong dalam kategori tinggi. Suatu koloni bakteri memiliki IP dibawah satu maka tergolong rendah ($IP < 1$). Apabila koloni bakteri memiliki IP antara 1 hingga 3 maka tergolong sedang ($1 > IP < 3$). Koloni bakteri dikatakan memiliki IP tinggi jika lebih dari 3 ($IP > 3$) (Cahyaningrum *et al.*, 2021). Isolat A9.5 memiliki IP tertinggi terjadi karena kemampuan mendegradasi asam amino yang dimiliki isolat tersebut lebih cepat jika dibandingkan dengan isolat lain. Menurut Litrinopiza (2021) perbedaan diameter zona bening disebabkan oleh beberapa faktor, seperti perbedaan jenis bakteri, perbedaan kecepatan pertumbuhan bakteri pada medium serta tipe enzim yang dihasilkan. Yuanita &

Prima (2014) dalam Litrinopiza (2021) menyebutkan bahwa tipe enzim yang dihasilkan oleh bakteri mempengaruhi terbentuknya zona bening. Tipe enzim memiliki kaitan dengan kemampuan bakteri untuk dapat menghasilkan enzim.

Penelitian mengenai uji aktivitas proteolitik secara kualitatif ini juga telah dilakukan oleh Jayanti (2022) di Sumber Air Panas Curup, Bengkulu. Pada penelitian tersebut diperoleh 10 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik dari total 44 isolat dengan indeks proteolitik terbesar, yaitu 5.34. Penelitian lain dilakukan juga oleh Rusdwitasari & Wikandari (2014) di Sumber Air Panas Singgahan, Tuban. Penelitian ini memperoleh 27 isolat memiliki aktivitas proteolitik dari total 75 isolat yang diisolasi dengan indeks proteolitik terbesar, yaitu 9.

Karakterisasi Morfologi Bakteri

Hasil karakterisasi isolat bakteri secara mikroskopis dan makroskopis dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil karakterisasi tersebut merupakan bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik berdasarkan hasil uji kualitatif aktivitas proteolitik. Hasil pewarnaan gram menunjukkan adanya isolat bakteri yang tergolong dalam bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan bentuk sel bakteri berupa basil dan kokus. Berdasarkan hasil tersebut terdapat 8 isolat bakteri memiliki bentuk sel basil sedangkan 3 isolat lainnya memiliki bentuk sel bakteri berupa coccus.

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa jumlah bakteri Gram positif lebih banyak jika dibandingkan dengan Gram negatif. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Majidah (2023) di Kawasan Wisata Ie Suum Aceh Besar yang memperoleh 15 isolat dengan 13 isolat bakteri Gram positif dan 2 isolat bakteri Gram negatif. Bakteri gram positif lebih banyak ditemukan karena bakteri tersebut memiliki dinding sel yang tebal dan cenderung stabil pada suhu tinggi (Saidah, 2014). Penelitian ini memperoleh bakteri gram negatif memiliki aktivitas proteolitik lebih besar jika dibandingkan dengan bakteri Gram positif

Tabel 2. Hasil karakterisasi morfologi bakteri

Kode Isolat	Bentuk sel	Gram	Elevasi koloni	Bentuk koloni	Tepi koloni
S5.1	Basil	+	Flat	Round	Entire
A9.3	Basil	+	Raised	Wrinkled	Irregular
A9.4	Basil	+	Flat	Rhizoid	Ciliate
A9.5	Kokus	-	Flat	Filamentous	Ciliate
A9.6	Kokus	+	Flat	Round	Undulate
A9.7	Basil	-	Flat	Filamentous	Branching
A9.8	Basil	+	Raised	Round	Entire
S9.9	Kokus	+	Flat	Round	Undulate
S9.10	Basil	+	Flat	Round	Undulate
S5.11	Basil	+	Raised	Round	Entire
S5.12	Basil	-	Convex	Wrinkled	Undulate

seperti halnya penelitian yang dilakukan oleh Litrinopiza (2021) yang memperoleh aktivitas proteolitik pada bakteri Gram negatif yaitu bakteri dari genus *Pseudomonas* dan *Vibrio*.

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Hasil uji aktivitas proteolitik secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat A9.5 memiliki aktivitas terbesar sehingga isolat tersebut digunakan untuk uji lanjutan yaitu kurva pertumbuhan bakteri. Pengamatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan selama 72 jam. Pada 12 jam awal sampling dilakukan setiap 3 jam sekali kemudian pada 12 jam akhir yang dimulai dari jam ke-12 hingga jam ke-24 sampling dilakukan setiap 2 jam sekali. Hal ini terjadi karena pertumbuhan bakteri yang sangat cepat. Penelitian ini menggunakan konsentrasi inokulum yang sebesar 5% sehingga pertumbuhan bakteri akan terlihat cepat. Menurut, semakin besar konsentrasi inokulum maka akan mempercepat pertumbuhan bakteri dengan mengurangi waktu adaptasi dan mempercepat fase eksponensial (Prayoga *et al.*, 2017). Sampling dilakukan kembali pada jam ke-48 dan jam ke-72 untuk mendapatkan fase kematian sel. Hasil kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa pertumbuhan isolat bakteri terdiri atas 4 fase yaitu, fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Gambar 4.3).

Fase lag (adaptasi) bakteri terjadi pada 3 jam pertama. Pada fase lag, bakteri belum mengalami pertumbuhan karena sel-sel bakteri masih beradaptasi dengan medium pertumbuhan. Menurut Hafsan *et al* (2021), adaptasi sel terhadap media baru berkaitan dengan enzim yang digunakan untuk memetabolisme sumber nitrogen dan karbon yang berbeda. Selain media, fase lag rentan terhadap perubahan suhu. Fase lag akan semakin singkat jika suhu lingkungan bakteri mendekati suhu optimum bagi pertumbuhan sel.

Fase eksponensial bakteri terjadi pada jam ke-6 hingga jam ke-12. Pertumbuhan bakteri tertinggi terjadi pada jam ke-12 (fase eksponensial). Fase eksponensial dapat dibuktikan dengan meningkatnya nilai OD dan digambarkan dengan grafik yang meningkat menunjukkan bahwa sel-sel bakteri aktif

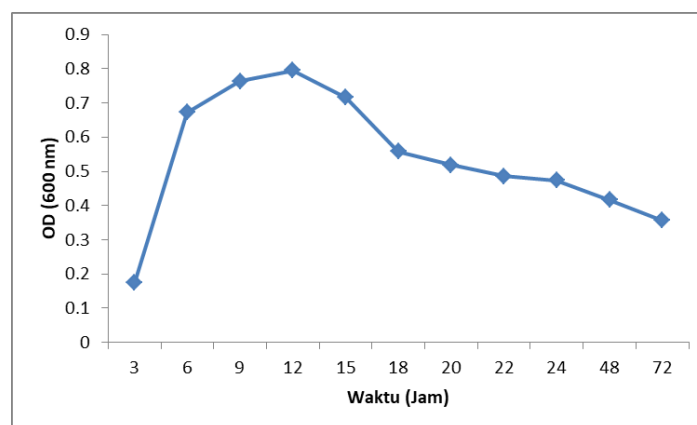
membelah. Kecepatan pertumbuhan sel disebabkan karena sel bakteri telah mampu memetabolisme nitrogen sebagai sumber sintesis asam amino dan karbon sebagai sumber energi untuk menyusun protoplasma. Ketika terjadi peningkatan energi maka pertumbuhan sel akan menjadi maksimal (Hafsan *et al.*, 2021)

Fase stasioner bakteri terjadi antara jam ke-12 hingga jam ke-15. Pada fase ini pertumbuhan bakteri mulai melambat yang disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang pada media. Fase kematian bakteri terjadi mulai dari jam ke-15 hingga jam ke-72. Pada fase ini grafik terus mengalami penurunan yang menandakan berkurangnya sel bakteri hidup karena nutrisi pada media yang sudah hampir habis (Risna *et al.*, 2022)

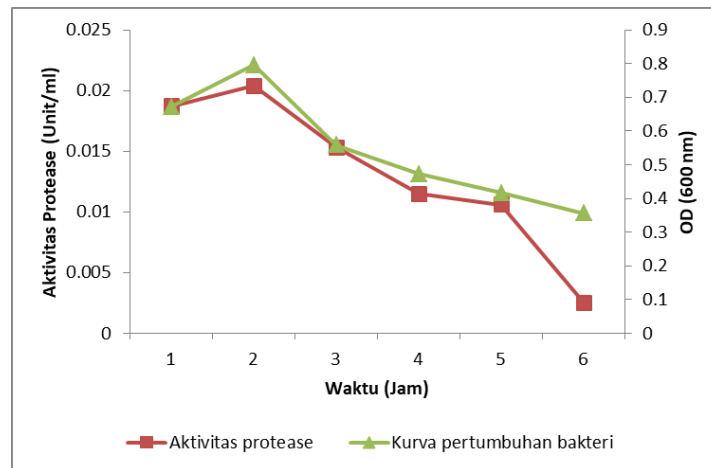
Pada fase kematian bakteri hasil pengukuran nilai OD menggunakan spektrofotometri tidak mencapai nilai 0. Hal ini terjadi karena pengukuran spektrofotometri tidak dapat membedakan antara sel hidup dan sel mati karena kedua sel tersebut dapat menghamburkan cahaya. Menurut Uthami & Irdawati (2024), pengukuran OD hanya memberikan gambaran kerapatan sel dalam suatu kultur mikroba. Hal tersebut memungkinkan pemantauan pertumbuhan populasi mikroba secara kuantitatif.

Pengujian Aktivitas Protease Secara Kuantitatif

Pengujian aktivitas protease secara kuantitatif didasarkan pada pengukuran kadar asam amino sebagai hasil hidrolisis pada substrat oleh enzim protease. Enzim protease akan menghidrolisis substrat berupa kasein menjadi asam amino dan peptide (Wibowo, 2021). Pengujian ini menggunakan beberapa bahan seperti kasein, TCA (*Trichloroacetic acid*), Na_2CO_3 , serta Reagen Folin Ciocalteu. Kasein sebagai substrat protein yang akan dihidrolisis oleh enzim protease menjadi peptida dan asam amino (Marnolia *et al.*, 2016). Reaksi enzimatik tersebut dihentikan oleh TCA (*Trichloroacetic acid*) dengan cara mengendapkan protein yang tidak terhidrolisis (Fitriana & Asri, 2021). Setelah pemisahan produk hidrolisis oleh TCA, terdapat penambahan Na_2CO_3



Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri A9.5



Gambar 3. Kurva perbandingan pertumbuhan dan aktivitas protease bakteri A9.5

yang berfungsi untuk mengoptimalkan pH untuk reaksi pewarnaan dengan reagen *Folin Ciocalteu*. Reagen *Folin Ciocalteu* akan bereaksi dengan asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease menghasilkan warna biru (Marnolia *et al.*, 2016).

Pengujian aktivitas protease ini dilakukan setiap 6 jam. Hasil pengujian dapat dilihat bahwa aktivitas protease tertinggi berada pada waktu inkubasi 12 jam (fase akhir eksponensial) dengan aktivitas sebesar 0.0204 unit/ml (Gambar 3). Hasil pengujian aktivitas protease terendah terjadi pada waktu inkubasi ke 72 jam (fase kematian), yaitu sebesar 0.0025 unit/ml. Jika dibandingkan dengan waktu pertumbuhan bakteri, aktivitas protease berkorelasi positif dengan pertumbuhan bakteri (Gambar 3).

Berdasarkan hasil tersebut, aktivitas protease pada fase eksponensial terjadi peningkatan yang diiringi dengan meningkatnya kurva pertumbuhan bakteri. Bakteri mengalami aktivitas protease tertinggi pada akhir fase eksponensial (jam ke-12). Tingginya aktivitas protease dikarenakan ketersediaan nutrisi yang cukup sehingga memungkinkan bakteri untuk melakukan pembelahan yang menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah sel bakteri. Pada fase eksponensial, bakteri akan lebih banyak memproduksi metabolit primer salah satunya adalah enzim. Metabolit primer ini sangat diperlukan untuk pertumbuhan bakteri salah satunya enzim protease (Fitriana & Asri, 2021).

Aktivitas protease tertinggi berada akhir fase eksponensial sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Prastika (2018) dengan sampel berupa isolat bakteri *Bacillus subtilis* dan Alrumman *et al* (2018) dengan sample isolat bakteri dari Sumber Air Panas Saudi. Penelitian lain juga dilakukan oleh Ahmetoglu *et al* (2015) dengan sampel bakteri *Bacillus* sp. KG5 dari Sumber Air Panas di Bingöl Turki menyebutkan bahwa aktivitas protease terbesar terjadi pada akhir fase eksponensial sementara itu Nazari & Mehrabi (2019) menyebutkan bahwa aktivitas protease terbesar terjadi pada awal fase

stasioner. Penelitian-penelitian tersebut menjelaskan bahwa bakteri mampu menghasilkan enzim protease secara maksimal pada fase eksponensial dan mengalami peningkatan pada awal fase stasioner.

Pada fase stasioner, laju pertumbuhan sel sama dengan laju kematian sel. Hal tersebut menyebabkan populasi total relatif stabil dan tidak terjadi penurunan drastis yang menandai kematian sel. Metabolisme bakteri pada fase ini akan melambat yang disebabkan oleh nutrisi yang terbatas (Efendi *et al.*, 2017). Pada fase ini aktivitas protease akan berkurang yang ditunjukkan dengan menurunnya grafik aktivitas proteolitik hingga fase selanjutnya, yaitu fase kematian sel bakteri. Aktivitas protease bakteri pada fase kematian terus mengalami penurunan. Penurunan ini berhubungan dengan ketersediaan nutrisi pada media. Nutrisi yang berada pada media menipis sehingga kemampuan bakteri untuk mensekresikan enzim protease semakin menurun (Fitriana & Asri, 2021).

Aktivitas protease yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Jayanti (2022) di Sumber Air Panas Curup Bengkulu dan Yuanita & Prima (2014) di Sumber Air Panas Singgahan Tuban. Hasil isolat dari Sumber Air Panas Curup Bengkulu memperoleh aktivitas protease tertinggi sebesar 0.128 U/ml sedangkan isolate dari Sumber Air Panas Singgahan Tuban memperoleh aktivitas proteolitik tertinggi sebesar 0.2489 U/ml. Perbedaan aktivitas proteolitik ini dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti perbedaan jenis bakteri penghasil enzim, perbedaan medium pertumbuhan bakteri, serta tipe enzim yang dihasilkan (Jayanti, 2022). Berdasarkan uraian tersebut maka isolat A5.9 perlu dilakukan dikarakterisasi lebih lanjut dengan variasi kondisi lingkungan seperti PH dan suhu serta medium sehingga didapatkan aktivitas enzim protease yang optimal.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa penelitian ini memperoleh 26 isolat bakteri hasil isolasi dari Sumber Air Panas Way Belerang dengan 11 isolat memiliki aktivitas proteolitik. Isolat A9.5 memiliki ciri karakter koloni elevasi flat, bentuk koloni filamentous, dan tepian ciliate, Gram negatif dan berbentuk kokus. Isolat A9.5 merupakan bakteri termofilik potensial dengan indeks proteolitik terbesar, yaitu sebesar 3.59 dan termasuk dalam kategori tinggi dan secara kuantitatif memiliki aktivitas sebesar 0.0204 unit/ml. Berdasarkan hasil tersebut Isolat A9.5 perlu dikarakterisasi lebih lanjut untuk mengoptimalkan aktivitas enzim proteasenya.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih atas pendanaan yang diberikan oleh Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian kepada Masyarakat (DRTPM), Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia. Penelitian ini didanai oleh skema Penelitian Dosen Pemula Regular dengan nomor kontrak 039/E5/PG.02.00.PL/2024 Juni 2024

DAFTAR REFERENSI

- Ahmetoglu, N., Bekler, F. M., Acer, O., Guven, R. G., & Guven, K. 2015. Production, Purification And Characterisation Of Thermostable Metallo-Protease From Newly Isolated *Bacillus* sp. KG5. *EurAsian Journal of BioSciences*, pp. 1–11. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2015.9.0.1>
- Alrumman, S., Mostafa, Y. S. M., Al-Qahtani, S., & Taha, T. H. T. 2018. Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Open Life Sciences*, 13(1), pp. 470–480. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0056>
- Awaludin Prihanto, A., Dwi Laksono Timur, H., Abdul Jaziri, A., Nurdiani, R., & Pradarameswari, K. A. 2018. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Mangrove *Sonneratia alba* Penghasil Enzim Gelatinase Dari Pantai Sendang Biru, Malang, Jawa Timur. *Indonesia Journal of Halal*, 1(1), pp. 31. <https://doi.org/10.14710/halal.v1i1.3114>
- Cahyaningrum, E., Wijanarka, W., & Lunggani, A. T. 2021. Isolasi dan Pengaruh Monosodium Glutamat terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Limbah Cair Tahu. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 23(2), pp. 84–90. <https://doi.org/10.14710/bioma.23.2.84-90>
- Coico, R., 2006. Gram Staining. *Current Protocol in Microbiology* (1)
- usra, Y., & Efendi, V. O. 2017. Optimasi Potensi Bakteri *Bacillus subtilis* sebagai Sumber Enzim Protease. *Akuatika Indonesia*, 2(1), 87. <https://doi.org/10.24198/jaki.v2i1.23417>
- Fachrial, E., Krisdianilo, V., Harmileni, H., Lister, I. N. E., Nugroho, T. T., & Saryono, S. 2021. Isolation, Characterization, Activity Test And Molecular Identification Of Thermophilic Bacteria Producing Proteases From Dolok Tinggi Raja Natural Hot Springs, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(4). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220416>
- Fitriana, N., & Asri, M. T. 2021. Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Trenggalek. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 11(1), pp. 144–152. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v11n1.p144-152>
- Hadioetomo, R. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Hafsan, H., Ramadani, K., & Abbas, A. 2021. Protease Activity Of Thermophilic Bacteria From Lejja Hot Springs In Soppeng South Sulawesi. *JST (Jurnal Sains dan Teknologi)*, 10(2), pp. 211–219. <https://doi.org/10.23887/jstundiksha.v10i2.38367>
- Jayanti, S., Aisyah. 2022. *Profil Pertumbuhan Dan Aktivitas Enzim Protease Dari Isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Curup, Bengkulu* [Skripsi]. Universitas Andalas.
- Kurniawan, H. M. 2017. Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-Proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup, Kab. Kerinci, Jambi. *Scientia Journal*, 6(1), pp. 62–68.
- Litrinopiza, I. 2021. *Uji Potensi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Protease Dari Sumber Air Panas Desa Air Panas Sungai Abu Kerinci Sebagai Materi Mata Mikrobiologi Terapan* [Skripsi]. Universitas Jambi.
- Majidah, R. 2023. *Isolasi dan karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Selulase di Kawasan Wisata IE Suum Kabupaten Aceh Besar* [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Ar-Raniry.
- Manik, S. S., & Simajuntak, S. 2020. Isolasi Dan Screening Proteolitik Bakteri Termofilik Lumpur Panas Danau Linow Tomohon. *Jurnal Nukleus Biosains*, 1(1), pp. 12–20.
- Marnolia, A., Haryani, Y., & Puspita, F. 2016. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Endofit Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis*). *Jurnal Photon*, 6(2), pp. 1–5.

- Mawati, S. D., Harpen, E., & Fidyandini, H. P. 2021. Skrining Bakteri Termofilik Potensial Amilolitik Dari Sumber Air Panas Way Belerang Kalianda Lampung Selatan. *Journal of Aquatropica Asia*, 6(1), pp. 1–7. <https://doi.org/10.33019/aquatropica.v6i1.2458>
- Nanda, P. T., Siregar, S. A., Kurniawan, R., Hairudin, Meriyanti, & Yatno. 2017. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Potensi Bakteri Penghasil Enzim Termotabil Air Panas Kerinci. *Chempublish Journal*, 2(1), pp. 26–31.
- Nazari, L., & Mehrabi, M. 2019. Purification and Characterization of an Extracellular Thermotolerant Alkaliphilic Serine Protease Secreted from Newly Isolated *Bacillus* sp. DEM07 from A Hot Spring in Dehloran, Iran. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, pp. 1–9.
- Pakpahan, R. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara* [Thesis Magister]. USU.
- Prayoga, F. A., Supriyadi, A., & Raharjo, B. 2017. Microbial Fuel Cell (Mfc) Menggunakan Bakteri *Bacillus subtilis* Dengan Substrat Limbah Septic Tank Serta Pengaruhnya Terhadap Kualitas Limbah. *Jurnal Biologi*, 6(2), 17–25.
- Putra, W. A., Diharmi, A. R., & Karnila, R. 2021. Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Kolagenase dari Organ Dalam Ikan Malong (*Congresox talabon*) pada pH Berbeda. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 13(1), pp. 27–30. <https://doi.org/10.17969/jtipi.v13i1.18587>
- Rahayu, S. 2014. *Isolasi Dan Karakterisasi Protease Dari Bakteri Sumber Air Panas Tamalantik Mamasa Sulawesi Barat* [Skripsi]. Universitas Hasanuddin.
- Rahmawati, L., Adlina, S., & Yuliana, A. 2021. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Protease Ekstraseluler dari Limbah Cair Tahu Putih. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analisis Kesehatan dan Farmasi*, 21(2), pp. 187–193.
- Rahmiati, R., Pujiyanto, S., & Kusdiyantini, E. 2016. Eksplorasi Mikroba Penghasil Enzim-enzim Hidrolitik Di Kawasan Taman Nasional Lore Lindu Sulawesi Tengah. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 18(2), pp. 14. <https://doi.org/10.14710/bioma.18.2.14-19>
- Risna, Y. K., Sri-Harimurti, S.-H., Wihandoyo, W., & Widodo, W. 2022. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 24(1), pp. 1-7. <https://doi.org/10.25077/jpi.24.1.1-7.2022>
- Rusdwitasari, Y. N., & Wikandari, P. R. 2014. Aktivita Bakteri Proteolitik yang Disolasi dari Sumber Air Panas Singgahan, Tuban. *Unesa Journal of Chemistry*, 3(3), pp. 183–188.
- Saidah, A. N. 2014. *Isolasi Bakteri Proteolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Penguji Aktivitas Enzim Protease* [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Simamora, C. J. K., & Sukmawati, S. 2020. Identification and Characterization of PrTK 2 Bacterial Isolate Producing Extracellular Protease Enzym From Tempeh Rubber Seeds. *Bioscience*, 4(1), pp. 79. <https://doi.org/10.24036/0202041108255-0-00>
- Susanti, R., Fibriana, F., & Aditya, A. C. 2017. *Teknologi Enzim*. Andi.
- Tuntun, M., & Huda, M. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Way Panas Bumi Natar Lampung Selatan. *Jurnal Analisis Kesehatan*, 3(1), pp. 297–304.
- Uthami, F. N., & Irdawati, I. 2024. Karakteristik Pola Pertumbuhan Bakteri Termofilik Isolat MS-12 dari Sumber Air Panas Mudiak Sapan. *MASALIQ*, 4(1), pp. 344–351. <https://doi.org/10.58578/masaliq.v4i1.2621>
- Wibowo, D. A. 2021. *Pengaruh Suhu dan Volume Enzim terhadap Aktivitas Protease yang Dihasilkan oleh Weisella confusa* [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Malik Ibrahim.
- Yassin, S. N., Jiru, T. M., & Indracanti, M. (2021). Screening and Characterization of Thermostable Amylase-Producing Bacteria Isolated from Soil Samples of Adera, Afar Region, and Molecular Detection of Amylase-Coding Gene. *International Journal of Microbiology*, 2021, pp.1–14. <https://doi.org/10.1155/2021/5592885>
- Yuanita, D. N., & Prima, R. W. 2014. Screening Bakteri Proteolitik dari Sumber Air Panas Singgahan Tuban. *Journal of Chemistry*, 3(3), pp. 49–54.
- Yuniati, R., Nugroho, T. T., & Puspita, F. 2015. Uji Aktivitas Enzim Protease dari Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *JOM FMIPA*, 1(2), pp. 116–122.