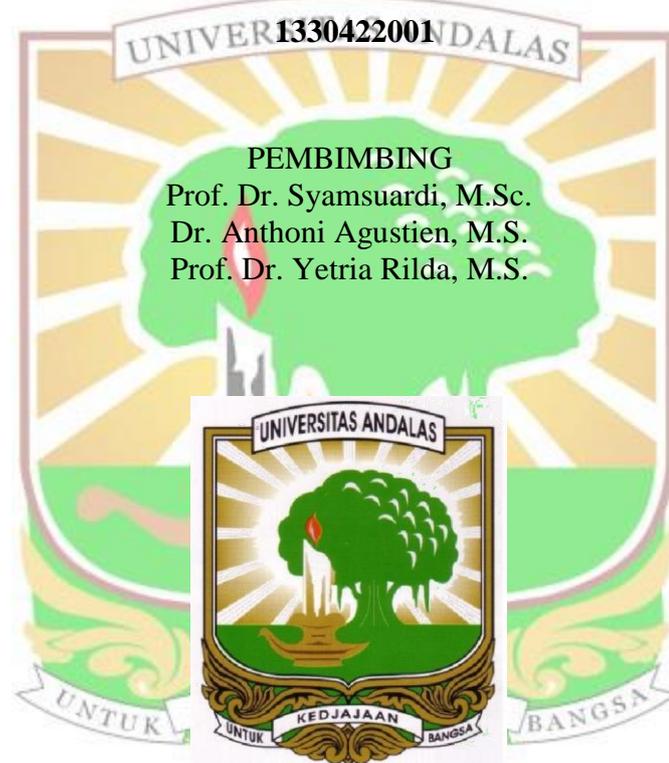


**KEANEKARAGAMAN *Bacillus* TERMOFILIK OBLIGAT DAN  
KERABATNYA PADA SUMBER AIR PANAS KERINCI JAMBI  
UNTUK MENGHASILKAN PROTEASE SERIN ALKALI YANG  
BERPOTENSI SEBAGAI ADITIF DETERJEN**

**DISERTASI**

**ARZITA**



**PROGRAM DOKTOR BIOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2018**

# KEANEKARAGAMAN *Bacillus* TERMOFILIK OBLIGAT DAN KERABATNYA PADA SUMBER AIR PANAS KERINCI JAMBI UNTUK MENGHASILKAN PROTEASE SERIN ALKALI YANG BERPOTENSI SEBAGAI ADITIF DETERJEN

**Arzita :** Di bawah bimbingan Prof. Dr. Syamsuardi, M.Sc. sebagai Ketua Komisi Pembimbing; Dr. Anthoni Agustien, M.S. dan Prof. Dr. Yetria Rilda, M.S. sebagai Anggota Komisi Pembimbing

## ABSTAK

Sumber air panas (SAP) Sungai Abu (SA) dan Sungai Tutung (ST) berasal dari aliran air panas gunung Kerinci, yang berada di dalam kawasan Taman Nasional Kerinci Seblat Kecamatan Air Hangat Kabupaten Kerinci Propinsi Jambi. Kedua SAP ini tergolong unik, karena memiliki pH alkali, suhu tinggi, dan beberapa mineral serta komponen botik berupa tumbuhan yang beragam. Kondisi kawasan SAP seperti ini sangat jarang dijumpai, dan biasanya memiliki diversity bakteri termofilik yang berlimpah. Oleh karena itu, kedua lokasi SAP ini, dapat digunakan untuk mengeksplorasi sumber bakteri penghasil enzim protease serin alkali (PSA), dari genus yang paling populer, yaitu *Bacillus* spp. termofilik obligat. Genus ini bersifat termostabil pada suhu tinggi dan pH alkali. Beberapa spesies dari *Bacillus* termofilik obligat dan kerabatnya, menghasilkan enzim PSA yang memiliki karakter memenuhi syarat untuk dijadikan sebagai aditif dalam beberapa deterjen komersial. Kebutuhan industri terhadap enzim PSA dari bakteri termofilik, selalu meningkat baik di dunia maupun di Indonesia. Menurut laporan Business Company Research Januari, 2017, pasar dunia untuk enzim industri sekitar 4,9 milyar USD pada tahun 2015, akan mencapai sekitar 6,3 milyar USD pada tahun 2021. Industri pengguna enzim PSA di Indonesia, sampai sekarang masih tergantung pada produk impor, dengan nilai perdagangannya melebihi dari 4-5 juta USD/tahun. dan setiap tahunnya meningkat sebesar 5-8%. Salah satu strategi untuk mengurangi impor enzim, adalah dengan meningkatkan produksi enzim dari beranekaragam bakteri termofilik yang berasal dari SAP yang terdapat di Indonesia. Penggunaan deterjen di Indonesia, untuk kebutuhan rumah tangga dan skala industri masih mengandalkan deterjen murni, sehingga proses deterjensinya belum sempurna. Produk deterjen dari negara maju telah menggunakan zat aditif berupa enzim PSA termostabil. Keuntungan peng-

gunaan deterjen dengan aditif enzim dapat mengurangi volume penggunaan deterjen, proses deterjensi lebih sempurna, dan memberikan dampak yang ramah lingkungan.

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) Menganalisis keanekaragaman *Bacillus* termofilik obligat dan kerabatnya, dari SAP SA dan ST Kerinci Jambi, dan penentuan golongan protease dari isolat terpilih; 2) Mengoptimalkan kondisi lingkungan ekstrinsik dari *Bacillus aerius* SA-16 dan *Fictibacillus gelatini* ST-8 strain baru termofilik obligat dari SAP SA dan ST Kerinci Jambi untuk peningkatan produksi enzim PSA; 3) Mendapatkan karakter enzim PSA yang baik dari *B. aerius* SA-16 dan *F. gelatini* ST-8; 4) Mengaplikasikan enzim PSA dari *B. aerius* SA-16 dan *F. gelatini* ST-8, sebagai aditif deterjen dan mengukur kestabilannya dalam deterjen.

Penelitian ini terdiri dari empat tahapan; Tahap Pertama, menganalisis keanekaragaman *Bacillus* spp. termofilik obligat dan kerabatnya, yang terdapat pada SAP SA dan ST Kerinci, Jambi, yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease alkali. dengan metode pour plate dan kuadran. Identifikasi enzim protease alkali berdasarkan kestabilannya terhadap inhibitor PMSF. Analisis morfologi, mikroskopis, biokimiawi, dan molekular menggunakan metode vitex dan 16S rRNA.

Tahap kedua adalah mengoptimalkan kondisi lingkungan ekstrinsik, untuk pertumbuhan *B. aerius* SA-16 dan *F. gelatini* ST-8 termofilik obligat dari SAP SA dan ST Kerinci Jambi, untuk peningkatan produksi enzim PSA. Optimasi dilakukan secara simultan terhadap 12 parameter, yaitu; Induser, dosis induser terbaik, dosis inokulum, suhu, pH, agitasi, sumber karbon, dosis karbon terbaik, sumber nitrogen, dosis nitrogen terbaik, C/N rasio dan jenis ion logam. Hasil optimal pada parameter ke-1, digunakan untuk parameter ke-2, begitu seterusnya sampai parameter ke-12.

Tahap ketiga adalah penentuan karakter enzim PSA dari *B. aerius* SA-16 dan *F. gelatini* ST-8 asal SAP (SA dan ST) Kerinci Jambi. Penentuan karakter enzim PSA secara simultan, terhadap; enam variasi suhu (50-90<sup>0</sup> C), tujuh variasi pH (7-10), enam variasi waktu interaksi (15- 90 menit), dan surfaktan (Tween-80 dan SDS).

Tahap keempat adalah uji potensi enzim PSA dari *B. aerius* SA-16 dan *F. gelatini* ST-8, sebagai aditif deterjen dan efisiensi deterjensi terhadap kain yang dinodai darah manusia. Empat macam deterjen yang tersedia di pasar lokal Kota Padang, ditambah dengan enzim PSA dan diuji kestabilannya pada suhu dan pH.

Aktivitas spesifik enzim PSA ditentukan pada setiap waktu inkubasi selama 30-270 menit. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji T.

Hasil yang didapat dari empat tahapan penelitian ini adalah ; Kelimpahan bakteri pada SAP ST lebih besar dari pada SAP SA, masing-masing terhitung sebesar  $11,28 \times 10^2$  dan  $9,61 \times 10^2$  sel/mL. Kelimpahan *Bacillus* spp. termofilik obligat dan kerabatnya sebesar  $7,45 \times 10^2$  dan  $6,00 \times 10^2$  sel/mL. *Bacillus* termofilik obligat dan kerabatnya terisolasi dari SAP SA dan ST sebanyak 35 dan 15 isolat, sebagian besarnya bersifat proteolitik, yaitu masing-masing sebanyak 28 isolat (80 %) dan 14 isolat (93 %), dengan IP berada pada kisaran 0,09 – 6,15. Hasil identifikasi dengan 16S rRNA menunjukkan, masing-masing sebanyak 26 dan 13 isolat merupakan strain baru, sebagai penghasil enzim protease alkali. Satu isolat dari masing-masing SAP SA dan ST, yang menghasilkan aktivitas spesifik protease alkali tertinggi dengan waktu fermentasi terpendek (8 jam), dan masa stabil terlama (6 jam), disebut sebagai isolat terpilih, kedua isolat ini dengan analisis 16S rRNA teridentifikasi sebagai *B. aerius* SA-16 dan *F. gelatini* ST-8. Produksi enzim dari kedua strain baru ini, dengan uji inhibitor PMSF tergolong kedalam kelas serin protease alkali (enzim PSA). Karena kedua enzim PSA ini lebih unggul dari pada yang diproduksi 40 strain lainnya, maka dilanjutkan dengan optimisasi, karakterisasi dan uji aplikasi.

Enzim PSA dari *B. aerius* SA-16 dan *F. gelatini* ST-8 ini, bersifat induktif terhadap trypton 2% pada medium produksi yang diinokulasi dengan 5 % inokulum, meningkatkan aktivitas spesifik enzim PSA, sebesar 93 % dan 111 %. Peningkatan suhu fermentasi sebesar  $5^{\circ}\text{C}$ , meningkatkan aktivitas spesifik sebesar 14 % dan 40%. pH medium produksi yang menghasilkan enzim PSA maksimal, adalah 8,5 dan 8,0. Peningkatan agitasi sebesar 25 rpm, dari 150 rpm ke 175 rpm, meningkatkan aktivitas spesifik enzim PSA sebesar 28 % dan 17 %. Suplementasi medium produksi dengan masing-masing 2 % sukrosa dan glukosa, meningkatkan aktivitas spesifik enzim PSA sebesar 15 % dan 80 %. Selanjutnya suplementasi 0,5 %  $\text{KNO}_3$  dan 1 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pada medium produksi, meningkatkan aktivitas spesifik enzim PSA sebesar 17% dan 19%. C/N rasio yang menghasilkan aktivitas spesifik enzim PSA maksimal, adalah penggunaan sukrosa/ $\text{KNO}_3$  sebesar 5 pada *B aerius* SA-16, dan glukosa/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  sebesar 7,5 pada *F. gelatini* ST-8. Penambahan ion logam Ca sebagai unsur kelumit pada medium produksi, meningkatkan hasil aktivitas spesifik enzim PSA sebesar

78 % dan 65 %. Secara keseluruhan hasil optimasi meningkatkan aktivitas spesifik masing-masing sebesar 0,041 – 3,236 U/mg dan 0,101 – 3,42 U/mg.

Enzim PSA dari *B. aeri*us SA-16 dan *F. gelatini* ST-8 asal SAP SA dan ST Kerinci Jambi, memiliki karakter suhu tinggi (termostabil). Aktivitas relatif maksimal (100 %), masing-masing pada suhu 70<sup>0</sup> dan 80<sup>0</sup> C, dengan aktivitas enzim PSAnyanya sebesar 35,09 U/mL dan 43,39 U/mL. Aktivitas dari kedua enzim PSA berada pada rentang pH alkali. Aktivitas relatif maksimal (100 %) pada pH 8,5 dan 9, dan aktivitas enzim PSAnyanya sebesar 39,14 U/mL dan 48,18 U/mL. Waktu interaksi terbaik antara enzim dan substrat adalah 30 menit, dengan aktivitas relatif 100 % dengan aktivitas enzim PSAnyanya sebesar 2,94 U/mL dan 3,54 U/mL. Waktu 30 menit ini, merupakan waktu yang cukup pendek dan sangat ideal untuk memproduksi suatu enzim PSA. Aktivitas enzimnya dapat dipertahankan dengan penambahan surfaktan Tween-80 dosis 2,5% dan 5% di atas 99% dan SDS dosis 0,5 % dan 1% di atas 80%.

Tingkat ketabilan aktivitas crude enzim PSA dari *B. aeri*us SA-16 dan *F. gelatini* ST-8, pada perlakuan enzim tunggal tanpa deterjen, menunjukkan lebih rendah dari pada perlakuan deterjen tunggal, Aktivitas spesifik crude enzim PSA tertinggi dari kedua strain baru ini, didapatkan pada penambahan deterjen CA, yaitu masing-masing sebesar 8,17 U/mg dan 7,82 U/mg. Hasil ini menurun berturut-turut dengan penambahan deterjen AR, DS, dan BD. Namun kedua crude enzim PSA ini, memiliki tingkat stabilitas yang cukup tinggi, dengan masa stabil yang cukup lama, sampai 270 menit yang diamati, masih memiliki aktivitas lebih dari 60 %. Enzim PSA dari kedua strain ini, dapat digunakan sebagai aditif dalam empat macam deterjen tersebut, karena memberikan hasil cucian kain yang lebih bersih tanpa meninggalkan noda, dengan kadar protein pada air cucian kain relatif tinggi, masing-masing pada perlakuan enzim dari *B. aeri*us SA-16 dan *F. gelatini* ST-8 terhitung sebesar 7,4-10,9 dan 8,6-12,6 mg/dl.