

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim adalah senyawa biomolekul yang memiliki kemampuan untuk mempercepat reaksi kimia tertentu (Yushkova *et al.*, 2019). Berbagai jenis enzim digunakan dalam berbagai industri, dari pengolahan makanan hingga pembuatan bahan kimia. Penggunaan enzim menjadi pilihan yang menarik bagi industri karena memiliki sifat yang unik, seperti efisiensi katalitik yang tinggi, spesifisitas dan ramah lingkungan (Kamble *et al.*, 2022). Salah satu contoh enzim yang digunakan dalam industri adalah enzim protease (Mahardhika *et al.*, 2021).

Enzim Protease adalah salah satu enzim penting yang telah digunakan secara luas dalam berbagai aplikasi di bidang industri dengan nilai komersial mencapai 60% dari total penjualan enzim di dunia (Razzaq *et al.*, 2019). Enzim protease digunakan pada beberapa aplikasi industri pangan dan non pangan. Enzim protease dapat digunakan untuk melunakan daging dan berperan dalam proses pembuatan keju. Pada industri non pangan, enzim protease digunakan dalam pabrik kertas, pengolahan kulit, pembuatan deterjen cair, farmasi dan industri kimia lainnya (Banerjee, 2017). Pada tahun 1960, Novo Industrial A/S berhasil memproduksi deterjen dari enzim alkalase yang berasal dari *Bacillus licheniformis* dan memasuki pasar dengan nama BIOTEX (Razzaq *et al.*, 2019).

Meningkatnya kebutuhan enzim protease di sektor industri, mendorong para peneliti terus mengupayakan untuk memproduksi enzim protease dari sumber daya hayati. Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri, umumnya diproduksi

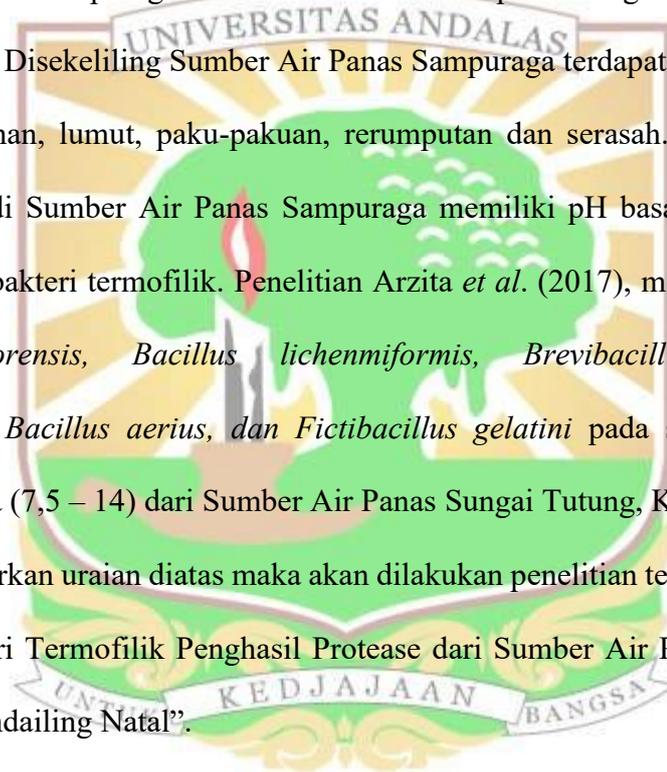
dari sel mikroorganisme (Utami & Supriyadi, 2018). Dalam pengaplikasiannya di industri, enzim yang diperlukan adalah enzim yang tahan terhadap suhu tinggi karena faktor utama yang dapat merusak enzim adalah suhu sehingga diperlukan enzim yang bersifat termostabil. Salah satu sel mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim termostabil adalah bakteri bersifat termofilik (Anfal *et al.*, 2020).

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang dapat beradaptasi pada habitat dengan kondisi lingkungan ekstrem pada suhu berkisar 45°–80°C. Salah satu habitat bakteri termofilik adalah sumber air panas (Suherman *et al.*, 2024). Bakteri termofilik memiliki kemampuan untuk beradaptasi pada suhu tinggi karena memiliki protein khusus yang dikenal dengan protein *chaperonin*. Membran sel bakteri termofilik terdiri dari asam lemak jenuh, yang memungkinkan bakteri tersebut dapat bertahan pada suhu tinggi. Selain itu, protein yang terdapat dalam sel bakteri termofilik memiliki ikatan ionik yang sangat kuat dan bersifat hidrofobik (Endah *et al.*, 2012 dalam Mawati *et al.*, 2021).

Berbagai penelitian telah berhasil memperoleh bakteri termofilik penghasil protease berdasarkan adanya zona bening, diantaranya Ginting (2020) mendapatkan 5 isolat bakteri termofilik yang positif menghasilkan enzim protease dari Sumber Air Panas Moinit, Sulawesi Utara. Runtuboi *et al.* (2018), memperoleh 7 isolat bakteri termofilik penghasil protease dari Sumber Air Panas Moso Distrik Muara Tami Kota Jayapura, Papua. Kurniawan (2017), dari Sumber Air Panas Semurup, Kabupaten Kerinci, Jambi didapatkan 120 isolat bakteri termofilik yang telah dilakukan inkubasi pada suhu 55°C selama 12 jam, 50 isolat potensial menghasilkan enzim protease.

Sumatera Utara merupakan salah satu provinsi yang terdapat sumber air panas, salah satunya yaitu Sumber Air Panas Sampuraga yang terletak di Desa Sirambas, Kecamatan Panyabungan Barat, Kabupaten Mandailing Natal. Sumber Air Panas Sampuraga ini sudah dikembangkan sebagai objek wisata dan tempat pemandian, namun belum digali sebagai sumber mikroorganisme termofilik. Belum ada yang melaporkan penelitian mikroorganisme termofilik dari Sumber Air Panas Sampuraga. Sumber Air Panas Sampuraga memiliki lima kolam air panas dengan suhu 45°C - 75°C dengan pH 7-8. Disekeliling Sumber Air Panas Sampuraga terdapat berbagai vegetasi seperti pepohonan, lumut, paku-pakuan, rerumputan dan serasah. Beberapa kolam yang terdapat di Sumber Air Panas Sampuraga memiliki pH basa yang berpotensi ditemukannya bakteri termofilik. Penelitian Arzita *et al.* (2017), menemukan spesies *Bacillus sonorensis*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus borstelensis*, *Paenobacillus*, *Bacillus aerius*, dan *Fictibacillus gelatini* pada sumber air panas dengan pH basa (7,5 – 14) dari Sumber Air Panas Sungai Tutung, Kerinci, Jambi.

Berdasarkan uraian diatas maka akan dilakukan penelitian tentang “Isolasi dan Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Protease dari Sumber Air Panas Sampuraga, Kabupaten Mandailing Natal”.



1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Apakah bakteri termofilik yang diperoleh dari Sumber Air Panas Sampuraga dapat menghasilkan enzim protease?
2. Bagaimana aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri termofilik dari Sumber Air Panas Sampuraga?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Memperoleh isolat bakteri termofilik penghasil enzim protease dari Sumber Air Panas Sampuraga.
2. Mengetahui aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri termofilik dari Sumber Air Panas Sampuraga.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dalam penelitian ini yaitu:

1. Meningkatkan nilai ekonomi yang diperoleh dari bakteri termofilik penghasil protease yang dapat digunakan dalam berbagai industri, sehingga membuka peluang baru untuk komersialisasi dan peningkatan keuntungan ekonomi.
2. Sebagai sumber informasi untuk penelitian lanjutan mengenai eksplorasi bakteri termofilik yang berindikasi penghasil enzim protease termostabil dari Sumber Air Panas Sampuraga.



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Termofilik

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang mampu bertahan pada suhu tinggi dengan suhu optimal pertumbuhannya pada suhu 45°C-80°C (Samuel, 2018). Menurut Brock (1986) dalam Mahestri *et al.* (2021), terdapat tiga cara bakteri termofilik dapat bertahan hidup pada suhu tinggi yaitu bakteri termofilik memiliki kandungan protein dan enzim yang tahan panas, memiliki membran termostabil yang akan memproduksi lemak dengan titik cair yang lebih tinggi saat suhu lingkungannya meningkat, serta bakteri termofilik dapat mensintesis molekul stabil, seperti enzim yang dapat memulai reaksi biokimia pada suhu tinggi dan lebih stabil daripada enzim yang dihasilkan dari bakteri mesofilik. Enzim-enzim potensial telah berhasil diidentifikasi dari bakteri termofilik seperti amylase, DNA polymerase, xylanase, kitinase, lipase dan protease (Dominguez *et al.*, 2005; Zang *et al.*, 2007; Bozoglu *et al.*, 2015; Scully & Orlygsson, 2015 dalam Ladeira *et al.*, 2015).

Kelompok bakteri termofilik termasuk ke dalam kelompok *Archaeobacteria* yang memiliki kemampuan untuk bertahan pada kondisi lingkungan ekstrem, seperti pH, suhu, kadar garam, tekanan dan oksigen. Senyawa lipid yang terdapat pada membran sel organisme termofilik memiliki ikatan eter. Ikatan ini terbentuk ketika gliserol atau senyawa poliol kompleks lainnya di kondensasi dengan alkohol isoprenoid yang mengandung 20, 25 atau 40 atom karbon. *Archaeobacteria* mengandung 2,3 O-sn-gliserol sebagai senyawa eter gliserol, struktur lipoprotein di membran sel termofil menjadi lebih stabil. Selain itu, sel termofil memiliki protein

chaperonin, yang melindungi struktur tiga dimensi protein fungsional sel dari denaturasi. Protein *chaperonin* stabil, tahan terhadap denaturasi dan proteolisis, dan dapat membantu organisme termofil mengembalikan fungsi aktifitas enzimnya setelah terdenaturasi (Pramiadi *et al.*, 2014).

Mikroorganisme termofilik dapat dikelompokkan menjadi 3 kategori berdasarkan suhu optimal (kardinal) nya, yaitu termofil sedang yang memiliki suhu tumbuh optimal (45°C-70°C), termofil ekstrem dengan suhu tumbuh optimal 55°C-85°C dan hipertermofil yang memiliki suhu tumbuh optimal 75°C-103°C (Rukmi *et al.*, 2018). Bakteri termofilik biasa ditemukan pada daerah yang memiliki aktivitas *geothermal*, seperti daerah kawah gunung berapi, sumber air panas, erupsi gunung berapi, tanah yang mengalami fermentasi kompos dan sedimen laut *geothermal* (Arji *et al.*, 2018). Pathak dan Rathod (2014) menemukan *Staphylococcus thermophilus*, *Bacillus licheniformis*, dan *Bacillus megaterium* yang telah berhasil diisolasi dari sumber air panas. Enzim yang dihasilkan termasuk kedalam kelompok enzim yang bersifat hidrolitik. Khaled *et al.* (2022), berhasil mengidentifikasi 2 bakteri termofilik yang mampu menghasilkan protease dari Sumber Air Panas Mesir yaitu *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus sonorensis*.

Mikroorganisme merupakan salah satu sumber enzim yang banyak diminati. Kelebihan menggunakan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yaitu enzim dapat dihasilkan dalam waktu yang sangat singkat, mudah diproduksi dalam skala besar dan proses produksi dapat dikontrol (Mahardhika *et al.*, 2021). Mikroorganisme menghasilkan berbagai jenis enzim ekstraseluler untuk menjaga metabolisme, pertahanan dan kondisi fisiologis normalnya sendiri. Bakteri dan jamur dilaporkan

menjadi sumber yang baik dari berbagai jenis protease seperti protease alkali, protease sistein, protease aspartat dan protease metalo (Banerjee, 2017). Selain itu, mikroorganisme mampu menghasilkan enzim yang dapat berperan pada suhu tinggi yang dikenal dengan enzim termostabil. Enzim termostabil ini dapat dimanfaatkan dalam sektor industri (Nanda *et al.*, 2017).

2.2 Enzim Termostabil

Enzim termostabil merupakan enzim yang tahan dan stabil terhadap panas serta bisa digunakan dalam berbagai industri (Irdawati *et al.*, 2021). Penggunaan enzim dalam industri harus memenuhi beberapa syarat enzim, yaitu aktif pada kondisi suhu dan pH tinggi karena pada umumnya proses dalam industri berlangsung pada pH dan suhu tinggi. Oleh karena itu, enzim termostabil dapat menjadi suatu alternatif yang dapat digunakan dalam bidang bioteknologi (Aminin *et al.*, 2022).

Sumber air panas merupakan salah satu habitat mikroorganisme termofilik yang dapat menghasilkan enzim termostabil. Berbagai jenis enzim dapat diisolasi dari bakteri termofilik, salah satunya yaitu enzim protease. Enzim-enzim termostabil mempunyai karakteristik biokimiawi yang menarik. Sifat termostabilitas enzim berkaitan dengan bagian asam-asam amino yang bersifat hidrofobik, intensitas interaksi elektrostatik dan jembatan disulfida di antara asam amino penyusun struktur protein (Suhartono, 2004 dalam Soeka *et al.*, 2011).

Pengisolasian bakteri termofilik dari berbagai sumber air panas terus dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan enzim termostabil untuk diterapkan di dunia industri. Enzim termostabil yang diisolasi dari bakteri termofilik memiliki beberapa kelebihan seperti reaksi berlangsung lebih cepat, menurunkan viskositas dan

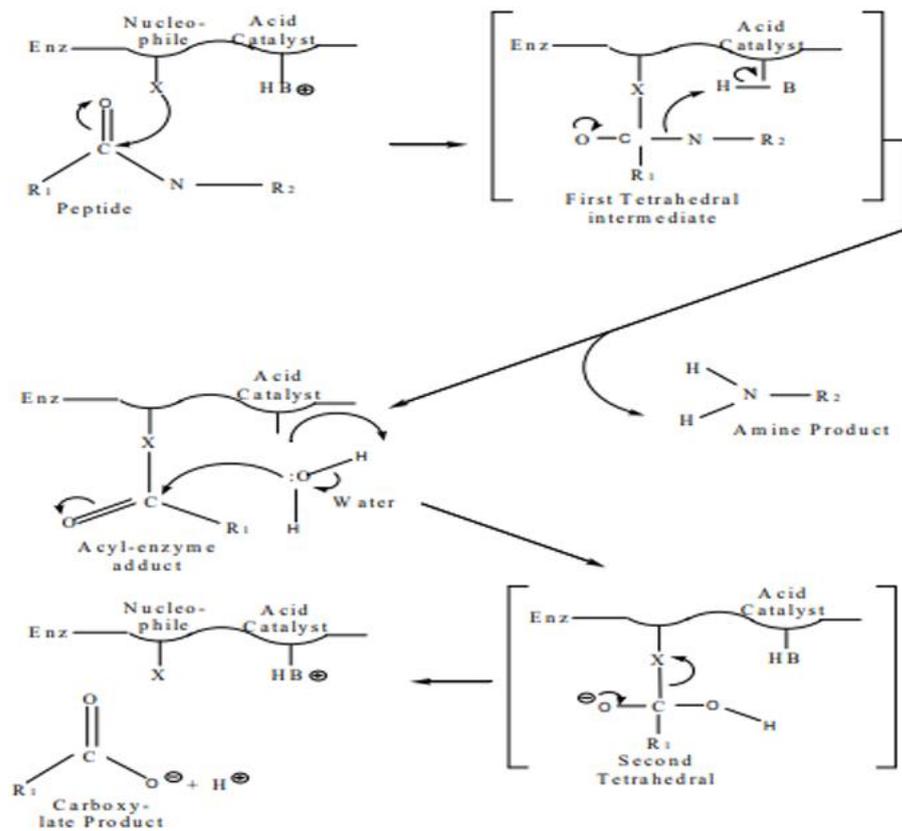
mencegah kontaminasi karena produksi berlangsung pada suhu tinggi (Nurul *et al.*, 2022).

2.3 Enzim Protease

Enzim 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. Selama bertahun-tahun, protease mikroba telah memainkan peran penting dalam produksi makanan fermentasi tradisional dan kini sektor enzim industri, yang didominasi oleh produk-produk protease mikroba, memasok dunia dengan biokatalis untuk digunakan dalam banyak industri. Protease mikroba dapat diklasifikasikan sebagai protease serin (E.C.3.4.21), protease sulfhydryl (E.C.3.4.22), protease asam (E.C.3.4.23) dan metaloprotease (E.C.3.4.24) (Baehaki *et al.*, 2011).

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama suhu dan pH. Karena enzim adalah protein yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan keasaman berubah, setiap enzim memerlukan suhu dan pH idealnya. Jika suhu dan pH tidak sesuai, maka enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan rusak (Supriyatna *et al.*, 2015). Karakteristik enzim protease termostabil dari berbagai strain bakteri termofilik memiliki suhu optimum, pH optimum dan berat molekul protease yang berbeda. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa bakteri termofilik mampu menghasilkan enzim protease yang aktif pada suhu 45°C-90°C dan stabil pada pH 7,0-11 (Anfal *et al.*, 2020). Spesies bakteri yang mampu menghasilkan protease antara lain dari genus *Bacillus*, *Staphylococcus*,

Flavobacterium, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas* dan *Halobacterium* (Sharma *et al.*, 2015).



Gambar 1. Mekanisme umum hidrolisis enzimatis substrat peptida
(Moran *et al.*, 1994, dalam Djamil *et al.*, 2021)

Dalam reaksi penambahan-penghilangan yang dikenal sebagai hidrolisis ikatan peptida, protease bertindak sebagai nukleofilik atau bereaksi dengan membentuk molekul air. Biasanya, nukleofilik membentuk intermediate tetrahedral dengan atom karbon karbonil pada ikatan peptida. Satu gugus amina dilepaskan dan dikeluarkan dari sisi aktif, yang digantikan secara bersamaan dengan satu molekul air dan akhirnya menghasilkan produk karboksilat, proton dan enzim bebas yang diregenerasi (Bauer *et al.*, 1996; Moran *et al.*, 1994 dalam Faizah, 2017). Protease secara garis besar dibagi lagi menjadi dua kelompok utama berdasarkan letak pemutusan ikatan peptida

protease, yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase memutus ikatan peptida di bagian ujung rantai peptida, pada gugus amino maupun gugus karboksil. Sedangkan endopeptidase memutus ikatan peptida yang spesifik pada bagian tengah rantai protein (Rawlings *et al.*, 2007 dalam Mareta *et al.*, 2017).

2.4 Manfaat Enzim Protease

Enzim protease yang dihasilkan mikroba menyumbang sekitar 60% total penjualan enzim di dunia. Enzim protease digunakan di berbagai bidang terutama di bidang industri. Baik industri pangan maupun non pangan memanfaatkan enzim protease dalam proses industri. Enzim protease pada industri pangan digunakan dalam proses pembuatan bir, pelunakan daging, pengolahan susu dan keju, dan industri non pangan seperti deterjen, tekstil, farmasi, dan pengolahan limbah (Poernomo *et al.*, 2017).

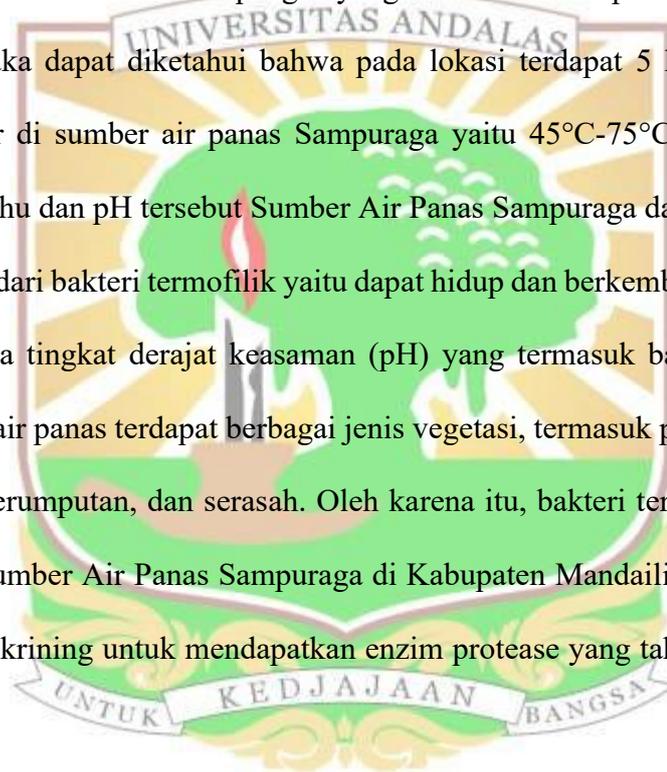
Enzim protease pada industri pangan berperan dalam proses degradasi protein seperti pada proses pengolahan keju, roti, hidrolisat protein dan pengempukan daging secara tradisional (Ratnayani *et al.*, 2018). Selain itu, industri pangan memanfaatkan protease untuk memperbaiki tekstur, mempersingkat waktu pencampuran dan meningkatkan volume adonan pada pembuatan roti, menjernihkan bir dan menggumpalkan susu. Menurut Song *et al.*, (2023) penggunaan enzim protease paling banyak dimanfaatkan dalam bidang industri deterjen yang bermanfaat dalam mengkatalisis noda yang mengandung protein pada pakaian.

2.5 Sumber Air Panas Sampuraga Kabupaten Mandailing Natal

Indonesia memiliki banyak sumber air panas yang dapat dimanfaatkan dan unik. Salah satu sumber air panas yang terdapat di Provinsi Sumatera Utara adalah Sumber Air

Panas Sampuraga. Sumber air panas ini terletak di Desa Sirambas, Kecamatan Panyabungan Barat, Kabupaten Mandailing Natal. Sumber Air Panas Sampuraga selama ini hanya dimanfaatkan sebagai objek pariwisata dan tempat pemandian saja, belum ada penelitian yang melaporkan terkait mikroorganisme termofilik.

Sumber Air Panas Sampuraga Kabupaten Mandailing Natal dapat menjadi habitat bagi bakteri termofilik dan berpotensi untuk menghasilkan enzim protease termostabil. Berdasarkan survei lapangan yang telah dilakukan pada sumber air panas Sampuraga, maka dapat diketahui bahwa pada lokasi terdapat 5 kolam sumber air panas. Suhu air di sumber air panas Sampuraga yaitu 45°C - 75°C dengan pH 7 –8. Dengan nilai suhu dan pH tersebut Sumber Air Panas Sampuraga dapat dikategorikan sebagai habitat dari bakteri termofilik yaitu dapat hidup dan berkembang pada suhu air 45°C - 80°C serta tingkat derajat keasaman (pH) yang termasuk basa. Selain itu, di sekitar sumber air panas terdapat berbagai jenis vegetasi, termasuk pepohonan, lumut, paku-pakuan, rerumputan, dan serasah. Oleh karena itu, bakteri termofilik penghasil protease dari Sumber Air Panas Sampuraga di Kabupaten Mandailing Natal diisolasi dan dilakukan skrining untuk mendapatkan enzim protease yang tahan terhadap suhu tinggi.



BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan dari bulan Desember 2024 sampai dengan bulan Februari 2025 bertempat di Laboratorium Biota Sumatera Universitas Andalas dan Laboratorium Riset Mikrobiologi Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

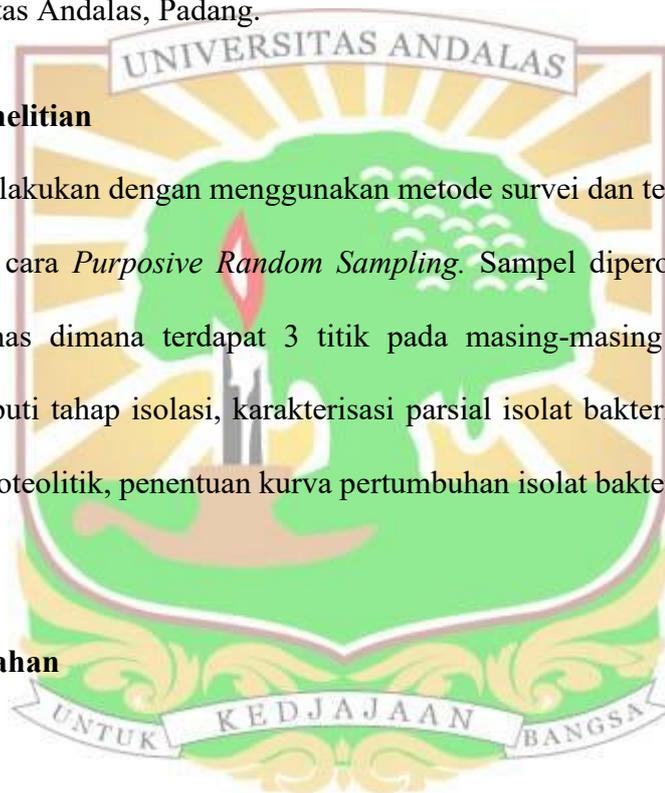
3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode survei dan teknik pengambilan sampel dengan cara *Purposive Random Sampling*. Sampel diperoleh dari 5 kolam sumber air panas dimana terdapat 3 titik pada masing-masing kolam. Tahapan penelitian meliputi tahap isolasi, karakterisasi parsial isolat bakteri, skrining bakteri yang bersifat proteolitik, penentuan kurva pertumbuhan isolat bakteri dan uji aktivitas enzim protease.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, termometer, pH meter, *thermal containers*, botol sampel, *swing sampler*, gelas piala, mikropipet, pipet tetes, *magnetic stirrer*, jarum ose, autoklaf, timbangan analitik, inkubator, *alumunium foil*, mikroskop, kapas, kain kasa, jangka sorong, rak tabung reaksi, lampu spiritus, *shaker*, *centrifuge*, mikrotips, tabung *effendroft*, *shaker incubator*, *hotplate*, *laminar air flow*, keranjang dan spatula.



3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel air panas yang berasal dari 5 kolam Sumber Air Panas Sampuraga, medium *Skim Milk Agar* (SMA), medium *Nutrient Agar* (NA), medium *Nutrient Broth* (NB), alkohol, kristal violet, safranin, air suling, iodine lugol (13k), minyak imersi dan *malachite green*, KH_2PO_4 , MgSO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , Kasein, Tris HCl, TCA, Na_2CO_3 dan *Folin Ciocalteu*.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Persiapan Penelitian

3.4.1.1 Sterilisasi

Alat dan medium yang akan digunakan terlebih dahulu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat dan bahan yang disterilisasi merupakan alat dan bahan yang tahan terhadap suhu tinggi.

3.4.1.2 Pembuatan Medium *Nutrient Agar* (NA)

Medium NA dibuat dengan menimbang NA sebanyak 20 g, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan air suling sebanyak 1000 mL. Selanjutnya medium dipanaskan sampai mendidih di *hotplate*. Setelah medium mendidih kemudian medium ditutup rapat dengan kapas dan *aluminium foil*. Lalu medium disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15-20 menit.

3.4.1.3 Pembuatan Medium *Skim Milk Agar* (SMA)

Pembuatan medium SMA menggunakan Susu Skim sebanyak 20 g dan Bacto Agar 15 g kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 1000 mL air suling. Selanjutnya medium dipanaskan di atas *hotplate* dan dihomogenkan menggunakan

magnetic stirrer. Kemudian medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.1.4 Pembuatan Medium Produksi Protease

Pembuatan medium produksi protease dimulai dengan melarutkan KH_2PO_4 3 g; MgSO_4 3 g; K_2HPO_4 3 g, NaCl 5 g dan Kasein 20 g lalu dicukupkan volumenya 1000 mL dengan penambahan air suling. Kemudian campuran medium dipanaskan hingga mendidih dan dituang kedalam erlenmeyer. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama lebih kurang 15 menit (Agustien, 2010).

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

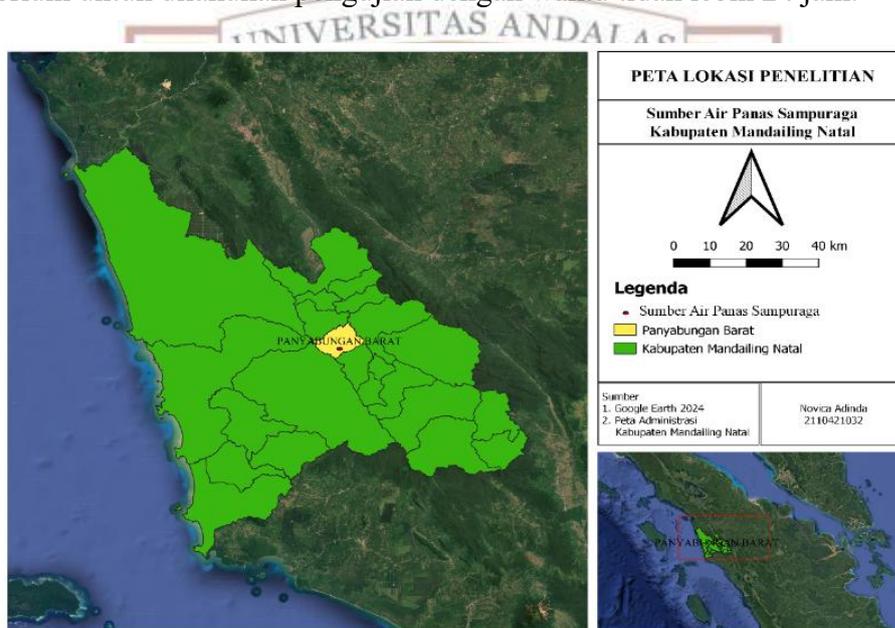
3.4.2.1 Pengambilan Sampel Air Panas

Sumber Air Panas Sampuraga terdiri dari 5 kolam dengan karakteristik yang berbeda disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik masing-masing kolam di Sumber Air Panas Sampuraga

Kolam	Titik	Suhu (°C)	pH	Vegetasi
I	1	75	8	Rumput, <i>mimosa pudica</i> , lumut
	2	75	7	
	3	68	8	
II	1	69	7	Paku-pakuan, rumput, <i>mimosa pudica</i>
	2	65	8	
	3	50	8	
III	1	69	7	Lumut
	2	71	8	
	3	72	7	
IV	1	73	8	Lumut
	2	74	7	
	3	72	6	
V	1	50	8	Lumut
	2	48	8	
	3	45	7	

Disekitar lokasi sumber air panas terdapat berbagai berbagai vegetasi seperti pepohonan, lumut, paku-pakuan, rerumputan dan serasah. Sampel air diambil menggunakan botol sampel, kemudian botol sampel diberi kode menggunakan kertas label. Selanjutnya botol sampel dimasukkan ke dalam *thermal containers* agar suhunya tetap panas. Setelah itu diamati faktor abiotik seperti suhu air, pH air dan faktor biotik yang ada di sekitar sumber air panas juga. Kemudian sampel dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pengujian dengan waktu tidak lebih 24 jam.



Gambar 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel

3.4.2.2 Isolasi Bakteri Termofilik

Pengisolasian dilakukan dengan menginkubasi sampel air yang ada di botol sesuai dengan suhu pada waktu saat pengambilan sampel selama 1 jam. Kemudian air dalam botol sampel dipipet 1 mL, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri. Selanjutnya dituang media NA sebanyak 15 mL, lalu diinkubasi disuhu 50°C selama 24-48 jam.

3.4.2.3 Pemurnian Bakteri Termofilik

Koloni-koloni bakteri yang tumbuh diinokulasikan ke cawan petri yang berisi medium NA, lalu digoreskan dengan metode *streak* ke media. Selanjutnya biakan diinkubasi dalam inkubator selama 24-48 jam dengan suhu 50°C. Selanjutnya diamati koloni bakteri yang tumbuh seperti besar koloni, jumlah koloni, bentuk koloni, elevasi koloni, pinggiran koloni kemudian koloni yang berbeda di inokulasikan pada biakan miring dan diberi label. Pemurnian ini dilakukan bertujuan untuk memperoleh biakan murni dari bakteri termofilik yang hidup di sumber air panas.

3.4.2.4 Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Protease

Skrining bakteri termofilik dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri termofilik pada cawan petri yang mengandung medium *Skim Milk Agar* (SMA) dengan menggunakan jarum ose. Kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 24-48 jam di dalam inkubator. Selanjutnya diukur diameter dari koloni bakteri dan zona bening yang terbentuk dengan jangka sorong. Isolat yang potensial penghasil enzim protease adalah isolat yang memiliki nilai indeks proteolitik (IP) ≥ 2 mm (Kurniawan, 2011). Perhitungan nilai IP menggunakan rumus:

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

3.4.2.5 Pengamatan Makroskopis

Pengamatan makroskopis isolat bakteri dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi pada bakteri termofilik yang sudah diisolasi sebelumnya. Parameter pengamatan makroskopis yaitu bentuk koloni, warna koloni, elevasi koloni dan pinggiran koloni.

3.4.2.6 Pengamatan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis isolat bakteri dilakukan pada bakteri termofilik yang sudah diisolasi sebelumnya. Parameter pengamatan yaitu pewarnaan Gram dan spora untuk mengetahui sifat Gram, bentuk sel serta letak spora.

3.4.2.6.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan meneteskan 1-2 tetes air suling ke kaca objek, kemudian diambil koloni bakteri menggunakan jarum ose dan diletakkan pada kaca objek. Selanjutnya dikering anginkan dan difiksasi dengan lampu spiritus. Setelah itu ditetaskan *crystal violet* 2-3 tetes dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Lalu ditetaskan 2-3 tetes lugol dan biarkan 1 menit. Dicuci dengan air mengalir kemudian dikering anginkan. Selanjutnya ditetesi dengan etanol 96%. Kemudian dicuci dengan air mengalir lalu ditetaskan safranin 2-3 tetes, dibiarkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya ditetesi dengan etanol 96%. Kemudian dicuci dengan air mengalir lalu ditetaskan safranin 2-3 tetes, dibiarkan selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Setelah itu, diamati di bawah mikroskop. Menurut Leboffe and Pierce (2010), apabila sel bakteri yang diwarnai menjadi keunguan maka termasuk kelompok bakteri Gram positif dan jika sel bakteri berwarna merah maka termasuk kelompok bakteri Gram negatif.

3.4.2.6.2 Pewarnaan Spora

Pewarnaan spora dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri dimasukkan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 2-4 hari pada suhu 50°C.

Kemudian, kultur bakteri diambil dengan 1-2 jarum ose dari kaca objek, dan bakteri disebarluaskan merata di kaca objek. Olesan bakteri kemudian dibiarkan kering dan difiksasi. Setelah itu, ditetaskan *malachite green* selama dua menit dengan pemanasan. Pastikan untuk tidak menguap atau mendidih. Kemudian dibilas dengan air suling dan ditetaskan safranin selama 30 detik. Kemudian dibilas lagi dan dikeringkan anginkan. Minyak emersi ditetesi kemudian diperiksa di bawah mikroskop.

3.4.2.7 Uji Biokimia

3.4.2.7.1 Uji Katalase

Pengujian katalase dilakukan dengan meneteskan satu ose air suling pada kaca objek. Selanjutnya, diambil isolat bakteri dan diletakkan pada kaca objek. Kemudian ditetaskan 1-2 tetes H₂O₂ 3%. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Kemampuan menghasilkan enzim katalase diketahui dengan adanya reaksi memecah hidrogen peroksida yang terbentuk dari hasil respirasi aerob yang bersifat toksik, menjadi hidrogen oksida (H₂O) dan oksigen (O₂). Hasil positif apabila terbentuk gelembung gas dan jika tidak ada maka mengindikasikan sebagai bakteri negatif katalase (Mawati *et al.*, 2021).

3.4.2.7.2 Uji Motilitas

Isolat bakteri termofilik yang berindikasi menghasilkan protease diinokulasikan secara vertikal ke dalam medium SIM semi padat ke tabung reaksi dengan menggunakan jarum ose. Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 50°C. Pertumbuhan koloni yang menyebar di permukaan medium menunjukkan bahwa bakteri tersebut bergerak (motil). Namun, jika pertumbuhan koloni bakteri hanya terdiri dari satu garis

lurus ke bawah sepanjang tusukan, bakteri tersebut menunjukkan tidak terjadi pergerakan (non motil).

3.4.2.8 Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Termofilik Penghasil Protease

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara disiapkan medium produksi protease sebanyak 100 ml pada erlenmeyer 250 ml yang telah disterilkan. Kemudian diinokulasikan 1-2 ose biakan miring masing-masing isolat pada media produksi protease. Diinkubasi pada suhu 50⁰C, agitasi 150 rpm selama 24 jam. Setelah itu dipipetkan 5 ml inokulum ke dalam 95 ml media produksi protease pada erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya dilakukan sampling 3 ml dari kultur bakteri (1,5 mL untuk diukur kekeruhannya dan 1,5 mL untuk pengujian aktivitas enzim. Pengukuran kekeruhan dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm. Pencuplikan kultur bakteri dilakukan dengan interval 1 jam dan cuplikan dihentikan setelah terjadi penurunan pertumbuhan isolat bakteri, diperoleh profil pertumbuhan masing-masing bakteri (Agustien, 2010).

3.4.2.9 Pengujian Aktivitas Enzim Protease

Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan metode Takami *et al.* (1989), yang menggunakan kasein sebagai substrat. Langkah kerjanya dimulai dengan menambahkan 0,5 mL larutan kasein 1% ke dalam tabung reaksi, lalu 0,5 mL larutan enzim. Setelah itu, tambahkan 0,25 mL Tris HCl buffer 50 mM pH 8,0 selanjutnya diinkubasi pada 50° C selama 10 menit, reaksi dihentikan dengan penambahan 0,5 mL TCA 10%. Prosedur yang sama dilakukan pada larutan standar (5 mmol/L tirosin) dan blanko (akuades). Kemudian masing-masing perlakuan diinkubasi pada suhu kamar

selama 20 menit, selanjutnya disentrifus pada 6000 rpm selama 20 menit. Supernatan sebanyak 0,375 mL dipindahkan ke dalam tabung reaksi baru, ditambah 1,25 mL Na₂CO₃ dan 0,25 mL 1N Folin Ciocalteu. Selanjutnya absorbansi dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 575 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan µmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran.

Aktivitas enzim dapat ditentukan dengan formula:

$$AE = \frac{(Asp - Abl)}{(Ast - Abl)} \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

- AE = Aktivitas enzim protease (U/ml)
- Asp = Absorbansi Sampel
- Abl = Absorbansi Blanko
- Ast = Absorbansi Standar
- T = Waktu Inkubasi (menit)

3.5 Analisis Data

Semua data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

