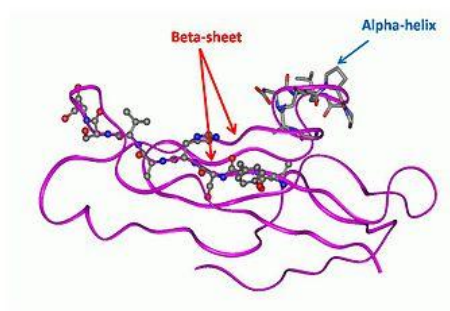


## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Protease

Protease disebut juga peptidase atau proteinase, merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptide. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Protein ini memiliki banyak struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* yang sangat pendek (Poliana, 2007).



Gambar 1. Struktur sekunder *beta-sheet* dan *alpha-helix* protein

Berdasarkan jenis residu asam amino dalam sisi aktifnya, protease dapat dibedakan menjadi empat golongan, yaitu protease serin, protease tiol, protease logam, dan protease karboksil (Creighton, 1986).

Hartley (1960) membagi protease menjadi 4 golongan :

1. Protease serin,
  - a. Memiliki residu serin dalam lokasi aktifnya.
  - b. Bersifat endopeptidase
  - c. Yang termasuk enzim ini: tripsin, kimotripsin, elastase dan subtilin
2. Protease sulfhidril
  - a. Memiliki residu sulfhidril pada lokasi aktif
  - b. Kerja enzim ini dapat dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat
  - c. Yang termasuk enzim ini : protease dari tanaman dan mikroba seperti papain, fisin dan bromelin
3. Protease metal
  - a. Keaktifannya tergantung pada adanya metal dengan hubungan stoikiometrik 1 mol metal/1 molenzim
  - b. Dapat dihambat oleh EDTA (Ethlene Diamine Tetra Acetic Acid) dimana dapat mengkelat metal sehingga keaktifan enzim hilang/berkurang.
  - c. Yang termasuk enzim ini : karboksipeptidase untuk beberapa amino peptidase
4. Protease asam
  - a. Enzim yang pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil
  - b. Aktif pada pH rendah, optimum 2,0-5,0
  - c. Keaktifannya dapat dihambat oleh *p*-bromo fenasilbromida.
  - d. Yang termasuk enzim ini : pepsin, renin dan protease kapang.

## B. Penghasil Enzim Protease

Enzim protease dapat dihasilkan dari berbagai sumber, yaitu bakteri, jamur, virus, tumbuhan, hewan dan manusia. Protease yang dihasilkan dari berbagai bakteri kebanyakan bersifat basa dan netral, sedangkan protease yang dihasilkan oleh berbagai jamur dapat bersifat asam, netral, dan basa (Rao *et al.*, 1998).

Salah satu sumber penghasil enzim protease yang banyak diteliti adalah bakteri.

Pemilihan bakteri sebagai sumber enzim protease disebabkan beberapa alasan yaitu:

- a. bakteri lebih mudah tumbuh dengan kecepatan yang lebih cepat dibandingkan makhluk hidup lainnya.
- b. skala produksi enzim mudah ditingkatkan.
- c. biaya produksi enzim relatif rendah.
- d. kondisi produksi tidak tergantung pada musim dan waktu proses produksi enzim lebih pendek (Poernomo, 2004).

Untuk memproduksi enzim protease dari bakteri, diperlukan proses pencarian, identifikasi dan isolasi galur unggul, yaitu galur yang menghasilkan enzim protease dalam jumlah dan aktivitas yang lebih tinggi. Selain itu, kondisi produksi juga perlu dikontrol dengan mengoptimasi berbagai faktor yang mempengaruhi laju pertumbuhan dan laju produksi enzim, seperti suhu, pH, komposisi medium (penambahan surfaktan dan logam), dan kondisi aerasi (transfer oksigen) (Palmer, 1995).

Untuk menguji suatu biakan bakteri menghasilkan enzim protease ekstraseluler, maka bakteri tersebut harus ditumbuhkan pada medium padat yang mengandung kasein yaitu Skim Milk Agar (Fardiaz, 1993). Kasein adalah salah satu jenis protein. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease yang memutuskan ikatan peptida CO-NH. Hidrolisis protein ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekeliling pertumbuhan bakteri (Susanti, 2003). Pengujian secara kualitatif bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler dilakukan dengan cara mengamati zona bening yang berada disekitar koloni bakteri, kemudian membagi diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Hasil bagi diameter tersebut dinyatakan sebagai aktifitas protease secara relatif (Sastono, 2008). Besar-kecil diameter zona menunjukkan konsentrasi dan aktivitas enzim yang dihasilkan (Palmer, 1995). Bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler disebut juga sebagai bakteri proteolitik.

### **C. Bakteri Proteolitik**

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Abraham *et al.*, 1993). Pada umumnya bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus* (Schlegel, 1994), *Streptobacillus*, *Staphylococcus* (A.H. Akmal, 1996).

Tingkat aktivitas proteolitik dapat dilihat dari keaktifan enzim dalam menghidrolisis protein. Aktivitas bakteri proteolitik dapat diketahui secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang ultra violet 280 nm. Panjang gelombang tersebut dapat ditangkap dan dipantulkan kembali oleh asam amino suatu protein berdasarkan gugus aromatik terutama asam amino tirosin, triptofan dan fenilalanin. Kelebihan metode ini yaitu sederhana, mudah serta tidak memerlukan penambahan reagen tertentu (Walker, 2002).

Semua bakteri umumnya mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler. Struktur protein yang lebih kompleks menyebabkan dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks dibandingkan pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi. Mikroorganisme melalui suatu sistem enzim yang kompleks, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Senyawa-senyawa intermediet dan produk akhir hasil pemecahan asam amino sangat bervariasi (Rao, *et al.*, 1998).

Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok (Rao, *et al.*, 1998):

1. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora, misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*.
2. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora, misalnya *Bacillus*.

3. Bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya sebagian spesies *Clostridium*.

#### **D. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim**

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat.

Pengaruh aktivator, inhibitor dan kofaktor dalam beberapa keadaan juga

merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim.

1. Efek suhu terhadap aktivitas enzim

Aktivitas enzim akan bertambah dengan *naiknya suhu* sampai tercapainya *aktivitas optimum*. Kenaikan suhu lebih lanjut akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim dan pada akhirnya merusak enzim (Pelczar, 1986).

2. Efek pH terhadap aktivitas enzim

*Perubahan pH* akan mempengaruhi *kecepatan reaksi enzim*, karena berubahnya derajat ionisasi gugus asam dan basa dari enzim. Sebagian besar enzim, mempunyai rentang pH optimum aktivitas enzim dan mempunyai tingkat stabilitas yang tinggi. Sebagian besar enzim mempunyai pH optimum yang mendekati netral, sebagian kecil lainnya mempunyai pH optimum yang sangat rendah (sekitar 2,0) atau sangat tinggi (sekitar 9,0).

3. Efek konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim

Pada enzim-enzim dengan derajat kemurniannya tinggi, terdapat suatu hubungan linear antara jumlah enzim dan taraf aktivitas pada batas-batas tertentu. Konsentrasi enzim pada umumnya sangat kecil, bila dibandingkan

dengan konsentrasi substrat. Saat konsentrasi enzim meningkat, maka aktivitas enzim juga bertambah (Pelczar, 1986).

#### 4. Efek konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim

Kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim juga sangat rendah. Sebaliknya, kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat sampai tercapai titik tertentu, yaitu titik batas kecepatan reaksi maksimum. Setelah titik batas, enzim menjadi jenuh oleh substratnya, sehingga tidak dapat berfungsi lebih cepat. Pembatas kecepatan enzimatik ini adalah kecepatan penguraian kompleks enzim-substrat menjadi produk dan enzim bebas (Lehninger, 1995).

#### 5. Efek aktivator, inhibitor dan kofaktor terhadap aktivitas enzim

Aktivitas katalitik enzim dapat dipengaruhi oleh aktivator (bahan-bahan yang meningkatkan aktivitas enzim) dan inhibitor (bahan-bahan yang menurunkan aktivitas enzim). Berdasarkan kinetiknya, inhibitor dapat dibedakan menjadi inhibitor ireversibel dan reversibel (Palmer, 1995).

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh kofaktor, yaitu komponen non protein dari enzim yang menentukan aktivitas katalitiknya. Kofaktor ini dapat berupa senyawa organik yang disebut koenzim atau senyawa non organik seperti ion logam  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  dan  $\text{Ca}^{2+}$  (Lehninger, 1995). Ion-ion logam ini umumnya ditambahkan dalam bentuk garam, misalnya ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam bentuk

garam klorida. Kation-kation lain yang telah diketahui dapat mengaktifkan enzim adalah  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , dan  $\text{Al}^{3+}$  (Palmer, 1995).

## **E. Karakter Fisiologi Bakteri Proteolitik**

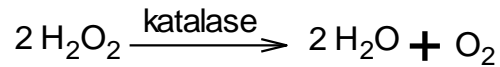
Karakterisasi fisiologis dilakukan untuk mengelompokkan taksonomi mikroorganisme termasuk taksonomi bakteri. Pengujian fisiologis terdiri dari uji motilitas, uji katalase, uji gelatin, dan uji fermentatif/oksidatif (Hadieotomo 1993)

### **1. Uji Katalase**

Uji katalase merupakan suatu pengujian terhadap bakteri tertentu untuk mengetahui bakteri tersebut merupakan bakteri aerob, anaerob fakultatif, atau anaerob obligat. Bakteri aerob menghasilkan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) yang sebenarnya beracun bagi bakteri sendiri. Namun untuk menjaga kelangsungan hidupnya, bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen sehingga sifat toksiknya hilang (Pelczar 1986). Pada umumnya bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif akan memproduksi hidrogen peroksida yang bersifat toksik terhadap bakteri yang masih hidup. Bakteri anerobik obligat akan mengalami kematian bila ada oksigen, disebabkan karena tidak adanya pembentukan enzim katalase sehingga  $\text{H}_2\text{O}_2$  meracuni bakteri itu sendiri. Ada tidaknya pembentukan enzim katalase dapat membantu pembedaan kelompok-kelompok bakteri tertentu (Hadieotomo 1993).



Persamaan reaksi yang terjadi pada uji katalase dapat dilihat pada gambar 2.

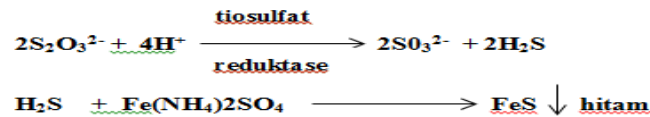


Gambar 2. Reaksi uji katalase dengan bakteri yang mengandung enzim katalase (Hadioetomo 1993)

## 2. Uji Motilitas

Motilitas adalah salah satu dari ciri mikroorganisme yang memiliki alat gerak sederhana berupa flagella atau cilia. Sebagai petunjuk adanya aktivitas motilitas, dapat diamati pada daerah bekas tusukan medium yang telah diinokulasikan oleh biakan dan diinkubasikan. Medium yang digunakan pada uji motilitas ialah *sulfide indol motility* (SIM). Pada medium ini ditambahkan senyawa anorganik yang mengandung sulfur, yaitu natrium tiosulfat. Natrium tiosulfat akan bereaksi dengan ion hidrogen dari air dan dengan adanya enzim tiosulfat reduktase, maka akan dihasilkan ion sulfid dan gas H<sub>2</sub>S. Gas ini akan bereaksi dengan feri ammonium sulfat yang ditambahkan (sebagai indikator untuk H<sub>2</sub>S) ke dalam media sehingga terbentuk FeS yang berwarna hitam. Pembentukan FeS inilah yang diamati sebagai penunjuk adanya aktivitas motil dari bakteri uji pada tabung yang berisi medium motilitas setelah diinkubasikan.

Berikut ini adalah mekanisme reaksi yang terjadi pada uji motilitas :



Gambar 3. Reaksi yang terjadi pada uji motilitas

### 3. Uji Gelatin

Uji gelatin digunakan untuk mengetahui keberadaan enzim gelatinase yang dimiliki oleh bakteri. Media yang digunakan ialah gelatin. Gelatin merupakan protein yang diperoleh dari hidrolisis kolagen yaitu zat pada jaringan penghubung dan tendon dari hewan. Gelatin akan terurai oleh jasad renik yang mempunyai enzim gelatinase. Larutan gelatin bersifat cair pada suhu ruang atau suhu kamar dan padat apabila berada di dalam refrigerator. Jika gelatin telah dihidrolisis oleh jasad renik maka akan tetap bersifat cair meskipun berada di dalam suhu dingin yang menunjukkan reaksi positif (Hadioetomo, 1993).

### 4. Uji Fermentasi

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Fermentasi pada umumnya menggunakan senyawa organik berupa karbohidrat yang dapat berupa gula dengan hasil akhir seperti etanol, asam laktat, dan hidrogen. Akan tetapi beberapa komponen lain dapat juga dihasilkan dari fermentasi seperti asam butirat dan aseton.

Fermentasi terbagi atas dua jenis, yakni homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif adalah fermentasi yang produk akhirnya hanya berupa asam laktat. Contoh homofermentatif adalah proses fermentasi yang terjadi dalam pembuatan yoghurt. Heterofermentatif adalah fermentasi yang produk akhirnya berupa asam laktat dan etanol sama banyak. Contoh heterofermentatif adalah proses fermentasi yang terjadi dalam pembuatan tape (Belitz, et al, 2009).

#### **F. Limbah Cair Nanas (LCN)**

Limbah Cair Nanas (LCN) memiliki karakteristik keasaman dan kandungan bahan organik yang tinggi dicirikan oleh parameter derajat keasaman (pH), BOD (Biological Oxygen Demand) 338 mg/L, COD (Chemical Oxygen Demand) 4200 mg/L, dan TSS (Total Suspended Solid) 390 mg/L (Julius,2009) belum memenuhi baku mutu yang dipersyaratkan. Pengolahan di Instalasi Pengolahan Limbah (IPAL) dengan sistem kolam (Lagoon) memerlukan tempat yang luas dan waktu tinggal lama sehingga kurang efisien. Berdasarkan masalah ini perlu teknologi pengolahan limbah yang berwawasan lingkungan dengan teknologi bioproses yang memanfaatkan kemampuan bakteri indigen pendegradasi polutan organik salah satunya dengan bioremediasi (Sutanto,2010).

Limbah organik merupakan limbah yang mengandung senyawa organik. Limbah organik yang berasal dari pertanian, industri maupun perkebunan merupakan limbah yang jumlahnya semakin meningkat. Salah satu komponen limbah

organik adalah protein yang dapat menjadi sumber nutrisi bakteri proteolitik. Protein akan didegradasi oleh mikroba menjadi asam amino (Schlegel, 1984), kemudian didegradasi lagi menjadi  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , dan Amonia ( $\text{NH}_3$ ) yang di lepaskan ke lingkungan. Amonia ( $\text{NH}_3$ ) diubah oleh mikroba menjadi ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) yang dapat bermanfaat bagi tanaman terutama untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Senyawa ini diserap melalui akar kedaun selama proses asimilasi yang kemudian ditransformasikan dalam bentuk asam amino (Indranada, 1994).