

## Pengaruh Konsentrasi NaCl Terhadap Aktivitas Spesifik Protease Ekstraseluler dan Pertumbuhan Bakteri Halofilik Isolat Bittern Tambak Garam Madura

Rahmad Budiharjo<sup>a</sup>, Purbowatiningrum Ria Sarjono<sup>a</sup> dan Mukhammad Asy'ari<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

\* Corresponding author: [asyari@live.undip.ac.id](mailto:asyari@live.undip.ac.id)

Article Info	Abstract
<p>Keywords: halophilic bacteria, proteases, azocasein, NaCl, specific activity</p>	<p>Halophilic protease can be utilized on food fermentation, such as on the manufacturing of fish sauce. The objectives of this study are to obtain halophilic bacteria from bittern isolate of Madura salt ponds, to isolate extra cellular halophilic protease and to determine the influence of NaCl concentration on the specific activity of halophilic protease. Adaptations of halophilic bacteria in HSB medium (Halophile Synthetic Broth). Protease activity measurement was done using azocasein substrat, and protein concentration was measured by lowry method. From this study, halophilic bacteria from the bittern isolate of Madura salt embankment were obtained. The bacteria grew optimally on NaCl concentration of 4% (w/v) with highest specific activity of extra cellular halophilic protease of 58.537 unit/mg of protein measured on the fraction 4 (60–80%). Furthermore, it was also observed that NaCl addition could increase the enzyme's specific activity to be 113.78 unit/mg of protein with the optimum NaCl concentration of 0.750 M.</p>
<p>Kata kunci: bakteri halofilik, protease, azokasein, NaCl, aktivitas spesifik</p>	<p>Abstrak</p> <p>Protease halofilik dapat dimanfaatkan pada proses fermentasi makanan seperti pada pembuatan kecap ikan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri halofilik dari isolat bittern tambak garam Madura dan mengisolasi protease halofilik ekstraseluler serta menentukan pengaruh konsentrasi NaCl terhadap aktivitas spesifik protease halofilik. Bakteri halofilik ditumbuhkan pada media HSB (<i>Halophile Synthetic Broth</i>). Penentuan aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan substrat azokasein dan kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry. Berdasarkan penelitian diperoleh bakteri halofilik isolat bittern tambak garam Madura yang tumbuh optimal pada konsentrasi NaCl 4 % (b/v), dengan aktivitas spesifik protease halofilik ekstraseluler tertinggi pada fraksi 4 (60–80 %) sebesar 58,537 Unit/mg protein. Adanya penambahan garam NaCl dapat meningkatkan aktivitas protease halofilik. Pada penelitian ini, aktivitas spesifik protease halofilik meningkat menjadi 113,78 Unit/mg protein dengan konsentrasi optimal NaCl 0,750 M.</p>

### 1. Pendahuluan

Madura merupakan salah satu sentra industri garam yang cukup besar di Indonesia. Para petani garam umumnya hanya mengambil kristal garam (NaCl) saja, sedangkan sisa hasil pemekatan (*bittern*) belum

termanfaatkan. *Bittern* mengandung berbagai macam mineral seperti  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ , NaCl dan KCl serta mikroorganisme yang tahan terhadap kadar garam tinggi, salah satunya adalah bakteri halofilik [1]. Bakteri halofilik dibedakan berdasarkan kemampuan hidup pada kadar NaCl yang berbeda-beda. Jenis bakteri

halofilik "rendah" mampu tumbuh optimal pada 2–5% NaCl, jenis "sedang" tumbuh optimal pada 5–20% NaCl dan jenis "ekstrim" tumbuh optimal pada 20–30% NaCl. Sedangkan bakteri non halofil tumbuh optimal pada kadar garam kurang dari 2% NaCl [2]. Kemampuan hidup pada kadar garam tinggi dikarenakan bakteri halofilik mampu mengakumulasi suatu zat organik terlarut di dalam sitoplasmanya. Tujuannya adalah untuk mencegah hilangnya cairan dari dalam sel akibat dari tingginya tekanan osmotik di luar sel karena meningkatnya konsentrasi NaCl. Zat organik terlarut meliputi *glycine betaine* dan *ectoin* [2].

Bakteri halofilik mampu menghasilkan enzim hidrolitik salah satunya adalah protease, yang berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis protein menjadi oligopeptida dan asam-asam aminonya [3]. Penentuan aktivitas protease dilakukan berdasarkan berkurangnya substrat azokasein pada kondisi percobaan. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai besarnya aktivitas enzim yang menyebabkan perubahan absorbansi 1% per mL pada panjang gelombang 440 nm pada kondisi percobaan [4]. Protease halofilik dapat dimanfaatkan pada proses fermentasi makanan seperti pada pembuatan kecap ikan [1]. Enzim halofilik mampu bertahan pada kadar garam tinggi, hal ini dikarenakan sebagian besar asam amino yang menyusun enzim halofil merupakan asam amino yang bersifat asam, yaitu asam amino yang memiliki rantai samping gugus karboksilat (COOH), misalnya asam glutamat dan aspartat [5].

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas protease halofilik adalah adanya garam, terutama NaCl [6, 7]. Kation dari garam akan mempertahankan kestabilan struktur protease halofilik melalui cara berikatan dengan muatan-muatan negatif dari gugus asam pada permukaan protease halofilik. Selain itu, adanya kation juga berperan dalam efek *shielding* (perlindungan) terhadap pengaruh kondisi lingkungan [1]. Berdasarkan penelitian Vidyasagar dkk. [8] berhasil menentukan aktivitas spesifik protease halofilik tertinggi yaitu sebesar 350 Unit/mg pada konsentrasi NaCl 20%.

Pengaruh garam NaCl tidak hanya pada pertumbuhan bakteri halofilik tapi aktivitas enzim halofilik juga. Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan pengaruh konsentrasi NaCl terhadap aktivitas spesifik protease ekstraseluler dan pertumbuhan bakteri halofilik isolat *bitten* tambak garam Madura.

## 2. Metode Penelitian

### Isolasi bakteri halofilik

Sampel *bittern* sebanyak 10 µL diinokulasikan kedalam 100 mL media *Enrichment halophile Broth* (EHB) yang terdiri dari 3 g glukosa; 1,5 g tripton; 1,5 g yeast ekstrak; 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 g NaCl dan 30 ml *bittern*, kemudian diinkubasi dalam orbital shaker inkubator pada temperatur 37 °C selama 24 jam dengan kecepatan 250 rpm. Sebanyak 10 µL isolat bakteri hasil dari media EHB diinokulasikan pada media *Enrichment Halophile*

*Agar* (EHA), menggunakan dengan metode spread. Inkubasi dalam inkubator pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Hasil dari metode spread selanjutnya diinokulasikan pada media EHA dengan metode. Hasil dari metode streak diambil 1 ose pada goresan terakhir, kemudian diinokulasikan dalam media EHB.

### Pengadaptasian bakteri pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Pengadaptasian dilakukan dengan mengganti komponen *bittern* dengan ASW (*Artificial Sea Water*) pada media. Isolat bakteri sebanyak 10 µL dari stok media EHB diinokulasikan ke dalam 100 mL media HSB. Pengadaptasian dilakukan dengan pengaturan komposisi *bittern* dan ASW, kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator pada temperatur 37 °C selama 24 jam dengan kecepatan 250 rpm.

### Uji morfologi dan pewarnaan Gram

Kultur bakteri dari media EHB dan HSB ditambah dengan larutan kristal ungu, reagen gram iodine, larutan alkohol aseton dan safranin. Pengamatan morfologi dan pewarnaan gram dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1500X

### Penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

Sebanyak 10 µL kultur hasil peremajaan (sebagai starter) diambil dan diinokulasikan pada 50 mL media HSB (variasi konsentrasi NaCl (%): 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 ). Inkubasi dalam orbital shaker inkubator pada suhu 37 °C selama 32 jam. Hasil inokulasi bakteri halofilik pada media HSB dengan variasi konsentrasi NaCl, selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas protease ekstrak kasar.

### Produksi enzim protease

Isolat bakteri hasil *starter* diambil 100 µL, diinokulasikan pada 1 liter media HSB dan diinkubasi dalam *orbital shaker inkubator* pada suhu 37 °C selama 32 jam berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri dan konsentrasi NaCl 4% berdasarkan penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

### Fraksinasi dengan garam amonium sulfat

Enzim ekstrak kasar dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0–20% (F1), 20–40% (F2), 40–60% (F3), 60–80% (F4), 80–100% (F5). Endapan dari setiap fraksi dipisahkan dengan sentrifugasi bertingkat, setrifugasi awal pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit dan 14000 rpm pada sentrifugasi berikutnya. Endapan yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan bufer fosfat 0,05 M, pH 8,0. Hasil fraksinasi kemudian dimurnikan kembali melalui proses dialisis dengan menggunakan membran selofan dan bufer fosfat 0,0005 M, pH 8,0.

Uji aktivitas enzim

Aktivitas protease ditentukan berdasarkan kemampuan protease mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan peptida pada substrat azokasein 2 % (b/v) selama 30 menit. Untuk larutan sampel, sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M pH 8,0 ditambah dengan aquades 0,625 mL dicampurkan dengan 0,125 mL larutan azokasein 2 %, kemudian diinkubasi pada suhu 4,0 °C selama 5 menit dalam *shaker water bath incubator*. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada kondisi optimum yaitu 40 °C selama 30 menit dalam *shaker water bath inkubator*. Setelah itu ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10 %. Campuran dikocok dan diinkubasi didalam air es sesaat. Untuk larutan blanko ( $t_0$ ), sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M pH 8,0 ditambah dengan aquades 0,625 mL dicampurkan dengan 0,125 mL larutan azokasein 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit dalam *shaker water bath inkubator*, setelah itu ditambahkan 1,5 mL TCA 10 % dan 0,5 mL larutan enzim yang telah dipanaskan. Campuran dikocok dan diinkubasi didalam air es sesaat. Larutan blanko dan larutan sampel disentrifus pada 6000 rpm selama 30 menit. Masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada 440 nm [9]. Kadar protein dapat ditentukan dengan menggunakan metode *Lowry* sehingga akan diperoleh nilai aktivitas spesifik protease.

Penentuan konsentrasi optimal NaCl terhadap aktivitas spesifik protease

Penentuan konsentrasi optimal NaCl dilakukan dengan menentukan aktivitas protease ekstraseluler pada berbagai konsentrasi NaCl (M) yaitu 0,125; 0,175; 0,225; 0,250; 0,500; 0,750; 0,100; 1,250 dan 1,500.

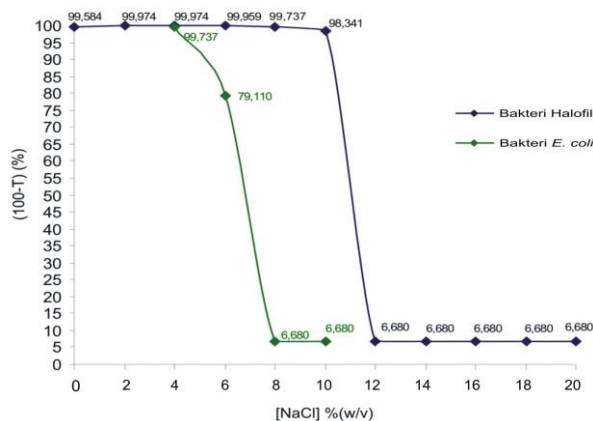
3. Hasil dan Pembahasan

Koloni tunggal bakteri halofilik telah berhasil diisolasi dari air pekatan sisa (*bittern*) tambak garam Madura menggunakan media *Enrichment Halophile Broth* (EHB). Kultur bakteri halofilik pada media EHB selanjutnya diadaptasikan pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB) secara bertahap agar diperoleh bakteri yang mampu beradaptasi pada media sintetis. Tujuan dari pengadaptasian adalah agar bakteri dapat ditumbuhkan kapan dan dimana saja tanpa tergantung pada sumber alaminya (*bittern*). Bakteri yang ditumbuhkan dalam media EHB dan HSB merupakan bakteri yang sama. Hal ini terlihat dari hasil morfologi berbentuk bulat (*coccus*) dan gram negatif.

Penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

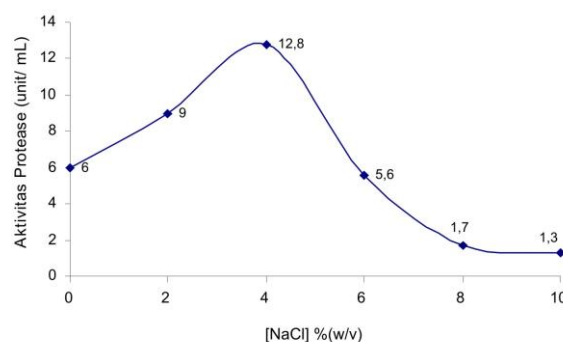
Penentuan konsentrasi optimal NaCl bertujuan untuk mendapatkan pertumbuhan bakteri yang optimal dan untuk menentukan jenis bakteri halofiliknya. Penginokulasian bakteri halofilik dilakukan pada media HSB dengan konsentrasi NaCl yang berbeda, selama waktu inkubasi 32 jam berdasarkan kurva pertumbuhan yang diperoleh. Perbedaan tingkat kekeruhan kultur pada berbagai konsentrasi NaCl menunjukkan adanya variasi pertumbuhan bakteri halofilik. Pertumbuhan

optimal bakteri halofilik terjadi pada konsentrasi NaCl 2% dan 4% ditunjukkan oleh nilai (100-T) sebesar 99,974 % (Gambar 1).



Gambar 1. Konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

Selain melakukan penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik, pada penelitian ini juga dilakukan penentuan aktivitas protease ekstraseluler yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi NaCl 4% merupakan konsentrasi optimal NaCl dengan aktivitas protease sebesar 12,8 Unit/mL (Gambar 2), sehingga bakteri halofilik ini termasuk jenis halofilik “rendah” yang tumbuh optimal pada 2-5% NaCl.



Gambar 2. Aktivitas protease ekstrak kasar halofil pada berbagai konsentrasi NaCl

Pada umumnya jenis bakteri halofilik ”rendah” dapat beradaptasi dengan konsentrasi garam tinggi melalui mekanisme akumulasi zat organik di dalam sitoplasmanya [2].

Fraksinasi Amonium Sulfat Bertingkat

Fraksinasi dilakukan untuk memurnikan enzim secara bertingkat menggunakan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda untuk memisahkan enzim protease dari protein lainnya. Penambahan garam ammonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadi kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out*. Fraksinasi ammonium sulfat dilakukan dengan tingkat kejenuhan 0-20% (F1), 20-40% (F2), 40-60% (F3), 60-80% (F4), 80-100% (F5). Setiap tahap fraksinasi diikuti dengan uji

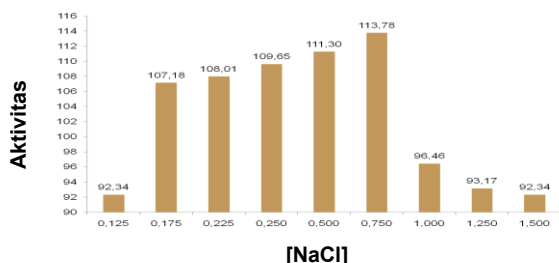
aktivitas protease yang terdapat di dalamnya sehingga dapat ditentukan fraksi optimalnya. Berdasarkan tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada fraksi 4 (F4) yaitu sebesar 58,537 Unit/mg protein, sehingga fraksi ini yang digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

Tabel 1. Hasil fraksinasi Amonium Sulfat protease ekstraseluler dari bakteri halofilik

Fraksi Enzim	Aktivitas Enzim (Unit/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (Unit/mg protein)	Kemurnian
EK	14,4	0,62833	22,917	1,000
F1	2,0	0,12314	16,242	0,708
F2	8,2	0,21240	38,606	1,685
F3	7,9	0,28796	27,434	1,197
F4	7,1	0,12129	58,537	2,554
F5	3,6	0,11759	30,614	1,335

**Penentuan konsentrasi optimal NaCl terhadap aktivitas spesifik protease halofilik**

Aktivitas spesifik protease halofilik sebesar 113,78 Unit/mg protein diperoleh pada konsentrasi optimal NaCl 0,75 M seperti disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Aktivitas spesifik protease halofilik pada berbagai konsentrasi NaCl

**4. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian diperoleh bahwa bakteri halofilik isolat bittern tambak garam Madura tumbuh optimal pada konsentrasi NaCl 4 % (b/v), aktivitas spesifik protease halofilik ekstraseluler tertinggi pada fraksi 4 (60–80 %) sebesar 58,537 Unit/mg protein. Penambahan garam NaCl secara umum dapat meningkatkan aktivitas protease halofilik. Pada konsentrasi NaCl optimal 0,75 M dapat meningkatkan aktivitas spesifik protease halofilik sebesar 113,78 Unit/mg protein.

**5. Daftar Pustaka**

[1] Aharon Oren, *Halophilic Microorganisms and their Environments*, Springer Science & Business Media, 2002.

[2] Shiladitya DasSarma, Priya DasSarma, *Halophiles*, in: *Encyclopedia of Life Science*, Wiley, 2006.

[3] Neil D. Rawlings, *Protease Families, Evolution and Mechanism of Action*, in: K. Brix, W. Stöcker (Eds.) *Proteases: Structure and Function*, Springer Vienna, Vienna, 2013, pp. 1–36.

[4] Jesse Charney, Rudolph M. Tomarelli, A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, *Journal of Biological Chemistry*, 171, 2, (1947) 501–505

[5] Clive Edwards, *Microbiology of extreme environments*, McGraw-Hill, 1990.

[6] Janos K. Lanyi, Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria, *Bacteriological Reviews*, 38, 3, (1974) 272–290

[7] Janos K. Lanyi, Joann Stevenson, Studies of the Electron Transport Chain of Extremely Halophilic Bacteria: IV. Role of Hydrophobic Forces in The Structure of Menadione Reductase, *Journal of Biological Chemistry*, 245, 16, (1970) 4074–4080

[8] Malashetty Vidyasagar, S Prakash, Carol Litchfield, K Sreeramulu, Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101, *Archaea*, 2, 1, (2006) 51–57

[9] Weraset Kanlayakrit, Preeyanuch Bovornreungroj, Takuji Oka, Masatoshi Goto, Production and characterization of protease from an extremely halophilic *Halobacterium* sp. PB407, *Kasetsart Journal: Natural Science*, 38, 5, (2004) 15–20