

SELEKSI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT POTENSIAL PENGHASIL ENZIM PROTEASE DARI TAMAN NASIONAL GUNUNG HALIMUN

(*The Selection and Identification of Potential Endophyte Bacteria as Protease Enzyme Producer from Halimun Mount National Park*)

Ruth Melliawati, Rohmattusolihat, Nuryati, Nanik Rahmani dan Yopi
Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Jl. Raya Bogor KM 46. Cibinong 16911, Indonesia
e-mail: ruthmell2000@yahoo.com

Naskah diterima 29 Januari 2016, revisi akhir 27 Juni 2016 dan disetujui untuk diterbitkan 28 Juni 2016

ABSTRAK. Bakteri endofit mempunyai peluang yang sama dengan bakteri yang hidup diluar jaringan tanaman sebagai bakteri potensial. Seleksi dilakukan terhadap 326 isolat bakteri endofit. Tujuan penelitian ini adalah mencari isolat yang berpotensi proteolitik dan mengidentifikasinya. Seleksi proteolitik terhadap bakteri endofitik menggunakan skim milk padat. Uji kemampuan bakteri endofitik dalam menggumpalkan susu menggunakan medium skim milk cair yang diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Produksi enzim terhadap empat isolat terseleksi dilakukan melalui fermentasi dalam medium GYS. Hasilnya menunjukkan bahwa 86 isolat mempunyai potensi proteolitik. Isolat HL.29B.63 mempunyai aktif enzim protease tertinggi (65,918 U/mL). Optimasi medium dapat meningkatkan aktivitas enzim sebesar 89,94% (125,04 U/mL). Analisis menggunakan 16s rDNA menunjukkan bahwa isolat HL.29B.63 adalah *Bacillus amyloliquefaciens* subs. *plantarum* strain FZB42.

Kata kunci: bakteri endofit, fermentasi, identifikasi, protease, seleksi

ABSTRACT. Endophytic bacteria have an equal chance to bacteria that live outside the plant tissue as potential bacteria. The selection has done towards 326 bacterial endophyte isolates. This research aimed to find and identify proteolytic potential isolates. The proteolytic selection of endophytic bacteria had done using solid skim milk. The capability of endophytic bacteria to agglomerate milk was tested using liquid skim milk which incubated for 7 days at room temperature. Enzyme production of four selected isolates was made through fermentation in GYS medium. The results showed that 86 isolates have proteolytic potential. Isolate HL.29B.63 had highest protease enzymes activity (65.918 U/mL). Medium optimization was able to increase the enzyme activity into 89.94% (125.04 U/mL). The analysis used 16s rDNA showed that isolate HL.29B.63 was *Bacillus amyloliquefacient* subs. *plantarum* strain FZB42.

Keywords: endophytic bacteria, fermentation, identification, protease, selection

1. PENDAHULUAN

Mikroorganisme, hewan dan tanaman/tumbuhan mempunyai peran penting dalam metabolisme untuk mendapatkan senyawa bioaktif dan enzim, misalnya pada tanaman berupa ekstrak papain dari pepaya (*Carica papaya*, Caricaceae) (Konno, *et al.*, 2004; Rani, *et al.*, 2012). Pada hewan, ekstrak chymotrypsin dari ekstrak pankreas (Rocha, *et al.* 2012; Rani, *et al.* 2012) dan

pada mikroba, ekstrak protease dari *Fusarium sp* BLB (Ueda, *et al.*, 2007). Mikroorganisme mewakili sebuah sumber protease intraseluler dan/atau ekstraseluler (Gupta, *et al.* 2002).

Kultur jamur endofit *Xylaria sp* DAP-KRI-5 memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Fathoni, *et al.*, 2013). Isolat bakteri endofit mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen tanaman

(*Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas solanacearum* dan *Colletotricum gloeosporioides*) (Melliawati, dkk., 2006). Tiga isolat kapang endofit yang berasal dari Taman Nasional Gunung Halimun dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 karena menghasilkan senyawa antibakteri (Melliawati dan Harni, 2009). Bakteri endofit yang berasal dari batang mangrove (*Avicennia marina*) menghasilkan antibiotik dan hasil uji biokimia menunjukkan bahwa isolat *Paenibacillus amylolyticus* yang bersifat motil menghasilkan enzim protease, amilase, mereduksi nitrat dan sulfur (Adiart, 2013). Bakteri *Enterobacter cloacea* bersifat motil, mampu merombak karbohidrat, menghasilkan enzim urease dan mereduksi nitrat. *Bacillus firmus* merupakan bakteri yang bersifat motil, menghasilkan enzim amilase, renin, protease serta mereduksi nitrat (Ardiati Retno, 2013).

Protease adalah salah satu enzim industri yang telah memperoleh kesuksesan secara komersial. Enzim ini dipergunakan di dalam berbagai industri mulai dari industri pangan (bir, roti dan kue, pengempuk daging, kecap dan protein hidrolisat), industri pengolahan kain sutra dan industri obat-obatan. Protease juga merupakan salah satu enzim utama yang digunakan secara luas sebagai deterjen, kulit, makanan, industri farmasi dan untuk proses bioremediasi (Najafi, *et al.*, 2005). Kebutuhan protease mencapai 60-65% dari pasar dunia enzim, hal ini menunjukkan pentingnya industri enzim tersebut (Saran, *et al.*, 2007).

Kebutuhan enzim protease terus meningkat sejalan dengan meningkatnya industri yang menggunakan enzim tersebut, sementara itu enzim yang digunakan masih impor. Untuk mengantisipasi ketergantungan pada impor maka diperlukan usaha, salah satunya untuk memproduksi enzim. Mikroba endofitik diyakini menjadi sumber-sumber potensial produk alami yang baru dan/atau bioaktif metabolit sekunder (Joseph dan Priya, 2011), meliputi spektrum yang luas dari kegiatan biologikal termasuk antibiotik, immunosupresan, senyawa anti

kanker dan antioksidan (Zhang, *et al.*, 2006). Senyawa tersebut memiliki potensi aplikasi dalam kedokteran, pertanian dan industri (Joseph dan Priya, 2011; Miles, *et al.*, 2012). Penelitian ini bertujuan untuk menseleksi dan mengidentifikasi bakteri endofit potensial penghasil enzim protease yang berasal dari Taman Nasional Gunung Halimun.

2. METODE PENELITIAN

Seleksi mikroorganisme dilakukan terhadap 326 isolat bakteri endofit dari tumbuhan yang berasal dari Taman Nasional Gunung Halimun. Medium yang digunakan adalah *skim milk agar*, *skim milk cair* 10% (yang disterilisasi pada 110°C selama 10 menit) dan media GYS yang berisi 0,3% glukosa, 1% *yeast extract*, 2% *skim milk* (Astutiati, 2010) dalam erlenmeyer 250 mL yang beisikan 50 mL medium.

Seleksi Bakteri Endofitik

Seleksi dilakukan dalam medium *skim milk agar* pada cawan Petri yg berisi 15 mL medium padat. Bakteri endofit yang berumur 24 jam diinokulasikan di atas medium *skim milk agar* menggunakan tusuk gigi steril kemudian diinkubasikan selama 72 jam. Zona jernih yang terbentuk diukur menggunakan metode dari Sukara (1987).

Uji Koagulasi Pada Medium *Skim Milk Cair*

Suspensi bakteri endofit yang berumur 24 jam sebanyak 2% (biakan bakteri dalam tabung dilarutkan dengan 2,5 mL akuades steril) diinokulasikan ke dalam 5 mL medium *skim milk cair* 10% dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 7 hari. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan medium (koagulasi, warna medium dan pH) (modifikasi dari Sato, *et al.* (2004)).

Proses Fermentasi

Suspensi dari isolat bakteri terbaik diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang berisi 50 mL medium sebanyak 3%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu

ruang selama 72 jam. Sampel hasil fermentasi disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit.

Analisis

Filtrat dari sampel hasil fermentasi diukur kadar proteinnya dengan menggunakan metode Hanson dan Philips (1981). Analisa aktivitas enzim protease menggunakan metoda Arima, *et al.* (1968) yang dimodifikasi, pengukuran pH akhir dan identifikasi bakteri terpilih menggunakan metode 16s rDNA.

Uji Aktivitas Enzim Protease

Kasien sebanyak 0,5% dilarutkan dalam 0,02 M buffer Potasium Fosfat sambil dipanaskan di atas penangas. Setelah larut, diambil 1,25 mL substrat kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan pada temperatur 35°C selama 30 menit di dalam *water bath*. Selanjutnya ditambahkan 0,25 ul enzim dan diinkubasi pada 35°C selama 10 menit (bila perlu enzim diencerkan lebih dulu) kemudian diangkat dan ditambahkan 1,25 mL TCA (0,44 M) lalu dikocok dengan menggunakan vortek, selanjutnya disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Filtrat diambil sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan 1,25 mL Na₂CO₃ (0,55 M) dan 0,5 mL Folin, selanjutnya divortek kemudian diinkubasi pada 35°C selama 20 menit. Terakhir dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm (Arima, *et al.*, 1968).

Optimasi Produksi Enzim Protease

Response surface method (RSM) dengan rancangan percobaan *Central Composite Design* (CCD) digunakan dalam optimasi produksi enzim protease dari isolat HL.29B.63. Analisis dilakukan dengan menggunakan *Software Statistic Design-Expert*®7. Parameter yang dibuat berupa tiga faktor, yaitu glukosa (X₁), *yeast extract* (X₂) dan *skim milk* (X₃) dengan kombinasi lima tingkat dosis seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Model yang digunakan yaitu *response surface*, mengikuti Persamaan 1. Y adalah respon (aktivitas enzim protease)

yang diproduksi, sedangkan X₁...X_j merupakan faktor yang diuji dan β₀ adalah *intercept* serta β₁...β_{ij} adalah koefisien regresi.

Tabel 1. Kombinasi tiga faktor dan lima tingkat kombinasi percobaan dengan CCD

Faktor (% w/v)	Level code factor				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Glukosa (X ₁)	0,13	0,20	0,3	0,40	0,47
Yeast extract (X ₂)	0,58	0,75	1,0	1,25	1,42
Skim milk (X ₃)	1,00	1,50	2,0	2,50	2,84

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j \dots (1)$$

Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan secara molekuler dengan menganalisis sebagian gen 16S rDNAny. Primer 9F: 5'-AGRG TTTGATCMTGGCTCAG-3' 1492R: 5'-ACGGYTACCTTGTT AYGACTT-3'. Pohon filogenetik disusun dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining*. *Bootstraping* dilakukan sebanyak 1000 kali pada program MEGA 6,06.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil seleksi terhadap 326 isolat bakteri endofit menunjukkan bahwa 86 isolat mempunyai potensi proteolitik. Isolat endofit dengan kode HL.29B.63 merupakan isolat yang memberikan luas zona bening tertinggi yaitu 3,26 cm² yang dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Menurut Melliawati, dkk. (2015), bakteri asam laktat yang berasal dari dadih memberikan indeks protease paling tinggi sebesar 3,82 cm² bila dibandingkan dengan bakteri endofit, hal ini menunjukkan bahwa bakteri endofit mempunyai kemampuan dan peluang yang sama dengan bakteri lain yang berasal dari bakteri terrestrial yang juga berasal dari makanan. Mikroba endofit tidak hanya bersifat protease tetapi beberapa bakteri endofit yang berasal dari tumbuhan Taman Nasional Gunung Halimun mempunyai potensi sebagai penghasil senyawa aktif

yang berguna untuk memproteksi serangan mikroba patogen seperti *Xantomonas campestris*, *Pseudomonas solanacearum*, *Colletroticum gloeosporioides* dan *Fusarium oxysporum* (Melliawati, dkk.,

2006). Demikian juga jamur endofit yang berasal dari batang tumbuhan *Albertisia papuana* Becc (Menispermaceae) memiliki aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* (Fathoni, dkk., 2013).

Tabel 2. Isolat bakteri endofit yang membentuk zona bening

No.	Kode Isolat	Luas Zona Bening (cm ²)	No.	Kode Isolat	Luas Zona Bening (cm ²)
1.	HL.7 B.10	1,036	38.	HL.72 B.151	0,678
2.	HL.11 B.16	1,250	39.	HL.72 B.153	0,750
3.	HL.14 B.23	0,821	40.	HL.73 B.155	0,666
4.	HL.14 B.24	1,250	41.	HL.74 B.156	0,536
5.	HL.18 B.33	0,857	42.	HL.74 B.158	0,726
6.	BL.23 B.45	0,476	43.	HL.75 B.161	1,036
7.	BL.24 B.48	0,738	44.	HL.81 B.178	0,630
8.	BL.26 B.53	2,143	45.	HL.82 B.181	0,321
9.	HL.29 B.62	1,309	46.	HL.82 B.184	0,964
10.	HL.29 B.63	2,226	47.	HL.83 B.185	1,023
11.	HL.30 B.64	0,928	48.	HL.85 B.189	0,905
12.	HL.31 B.66	0,405	49.	HL.85 B.190	0,595
13.	HL.32 B.70	0,559	50.	HL.86 B.191	0,238
14.	HL.32 B.71	1,036	51.	HL.89.B.197	0,619
15.	HL.33 B.74	1,393	52.	SKB.94.B.238	0,809
16.	HL.34 B.76	0,857	53.	SKB.95.B.244	0,916
17.	HL.36 B.78	1,083	54.	SKB.97.B.264	1,024
18.	HL.37 B.81	0,976	55.	JKY.98 B.269	0,261
19.	HL.38 B.82	0,809	56.	LLD.101.B.281	1,048
20.	HL.38 B.83	0,988	57.	CBN.1B.1	0,393
21.	HL.39 B.84	1,238	58.	CBN.1.B.2	0,250
22.	HL.39 B.88	1,250	59.	CBN 1.B.3	0,670
23.	HL.41 B.93	0,262	60.	CBN.2.B.9	0,226
24.	HL.42 B.95	0,298	61.	CBN.2.B.10	0,226
25.	HL.46 B.101	1,655	62.	CBN B.22	0,660
26.	HL.51 B.108	0,381	63.	CBN.6.B.24	0,905
27.	JB.53 B.112	0,952	64.	CBN.6.B.25	0,548
28.	JB.53 B.113	0,750	65.	CBN.8.B.29	0,500
29.	JB.54 B.114	0,774	66.	R.5.B.12	0,666
30.	JB.54 B.115	0,809	67.	CBN.7.Y.4	0,512
31.	JB.56 B.117	1,119	68.	CBN.7.Y.5	1,154
32.	JB.62 B.125	0,500	69.	CBN.7.Y.6	0,964
33.	JB.62 B.127	0,559			
34.	HL.67 B.135	0,571			
35.	HL.68 B.140	1,083			
36.	HL.68 B.141	0,166			
37.	HL.68 B.142	0,524			



Gambar 1. Zona bening isolat HL.29B.63

Uji Koagulasi Pada Medium *Skim Milk Cair*

Pengujian menggunakan medium *skim milk* cair 10%, hasilnya menunjukkan bahwa penggumpalan (koagulasi) susu terlihat berbeda pada setiap isolat. Jumlah isolat dan kondisi penggumpalan susu diantara isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah bakteri endofit yang mampu mengkoagulasi susu skim dengan hasil fermentasi yang berbeda

No.	Kondisi susu yang terkoagulasi selama inkubasi 7 hari	Jumlah isolat yang mampu mengkoagulasi susu
1.	A	7
2.	B	7
3.	C	11
4.	D	18
5.	E	19
6.	F	17
7.	G	3
8.	H	1
9.	I	2
10.	J	1

Tujuh isolat bakteri endofit mampu merubah susu cair menjadi padat seluruhnya (A). Koagulasi terjadi karena bakteri endofit tersebut mempunyai enzim protease asam (rennin) yaitu enzim yang mempunyai sisi aktif pada dua gugus karboksil. Disamping itu, kemungkinan juga terkandung enzim protease lain yaitu pepsin tetapi rennin jauh lebih baik dalam menggumpalkan kasein susu. Kemungkinan lain karena perubahan pH medium menjadi asam. Sementara ada 2 isolat yang tidak mampu merubah media

susu sedangkan bakteri yang lainnya terbentuk padatan dan *whey* dengan hasil yang berbeda-beda.

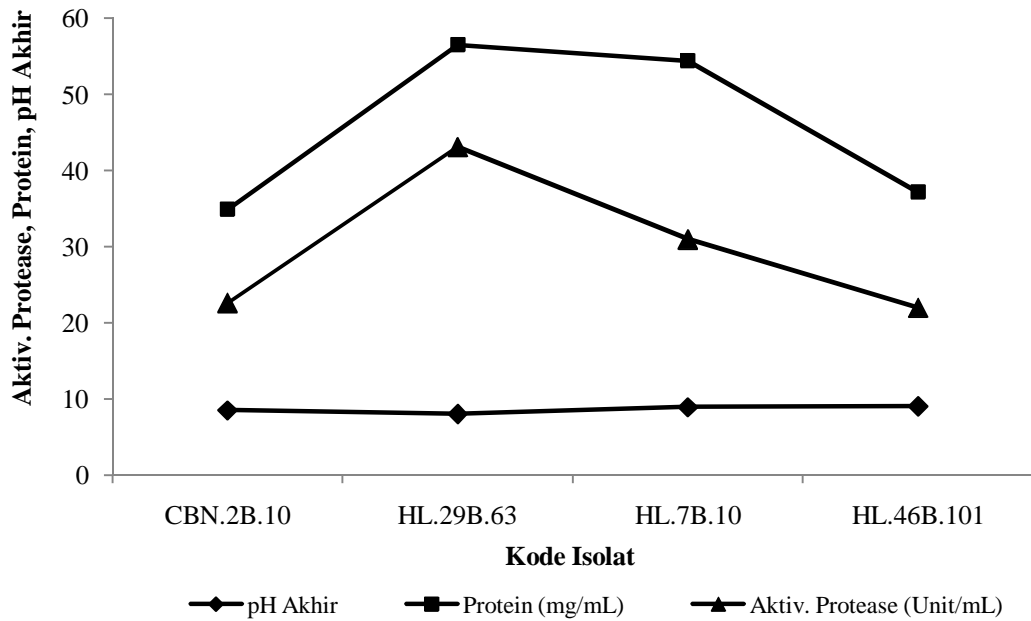
Tujuh isolat bakteri menunjukkan sebagian besar medium memadat dan sedikit cairan bening (*whey*) (B), 11 isolat memperlihatkan 4/5 bagian medium memadat dan sedikit terbentuk *whey* (C), 18 isolat hasilnya 2/3 bagian medium memadat dan 1/3 bagian terbentuk *whey* (D), 19 isolat bakteri menghasilkan 1/2 bagian medium memadat dan 1/2 bagian terbentuk *whey* (E), 17 isolat bakteri memperlihatkan 1/2 bagian medium memadat dan 1/2 bagian terbentuk *whey* (F), 3 isolat bakteri terlihat 3/4 bagian medium memadat dan 1/4 bagian terbentuk *whey* (G), 1 isolat bakteri terlihat 1/5 bagian medium memadat dan 4/5 bagian terbentuk *whey* (H), 2 isolat bakteri menunjukkan pada medium sedikit mengendap, sebagian besar terbentuk *whey* (I), 1 isolat bakteri dapat merubah medium seluruhnya menjadi bening (*whey*) (J).

Proses Fermentasi

Berdasarkan hasil uji kemampuan menghasilkan zona jernih dan juga terhadap kemampuan koagulasi kasein susu, maka 4 isolat (CBN.2B.10, HL.29B.63, HL.7B.10 dan HL.46B.101) dipilih untuk proses fermentasi. Gambar 2 memperlihatkan aktivitas protease tertinggi yang diperoleh sebesar 43,12 unit/mL pada isolat bakteri HL.29B.63 dan setelah dilakukan pengulangan diperoleh protease sebesar 65,918 unit/mL. Hasil tersebut lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas enzim protease (*crude enzyme*) dari *Bacillus* sp. (isolat yang berasal dari susu skim bubuk) yaitu sebesar 5,71 U/mL (Naiola dan Widhyastuti, 2007).

Optimasi Produksi Enzim Protease

Optimasi terhadap medium produksi dilakukan untuk meningkatkan aktivitas enzim. Rancangan percobaan optimasi enzim protease dari isolat HL.29B.63 menggunakan CCD. Hasil pengujian dari 3 faktor yaitu glukosa, *yeast extract* dan *skim milk* diperlihatkan pada Tabel 4.



Gambar 2. Grafik aktivitas protease, protein dan pH akhir dari hasil fermentasi oleh 4 isolat bakteri terseleksi selama 72 jam.

Hasil optimasi enzim protease dianalisis dengan analisis varian. *Yeast extract*, *skim milk* dan interaksi antara *yeast extract* dan *skim milk* secara signifikan mempengaruhi produksi enzim protease seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5. Berdasarkan hasil ANOVA, model regresi terbaik (Tabel 6) dengan nilai regresi (R^2) sebesar 0,95 ditentukan dengan menggunakan Persamaan 2. X_2 dan X_3 masing-masing menunjukkan *yeast extract* dan *skim milk* sedangkan Y adalah aktivitas enzim protease. Koefisien regresi dan signifikansi dari model *Response Surface Quadratic* dapat dilihat pada Tabel 6.

$$Y = 65,949 + 29,758X_2 + 17,908X_3 + 10,125X_2X_3 \dots (2)$$

Grafik hasil percobaan divisualisasikan dalam bentuk tiga dimensi dan plot *contour* dari *response surface* yang menunjukkan hubungan antara dua faktor yang saling berinteraksi terhadap enzim protease.

Tabel 4. CCD tiga faktor dengan lima level kombinasi

No.	Glukosa	YE	Skim Milk	Aktiv. Protease (U/mL)
1.	-1	-1	-1	32,754
2.	1	-1	-1	21,304
3.	-1	1	-1	55,507
4.	1	1	-1	70,870
5.	-1	-1	1	45,362
6.	1	-1	1	42,754
7.	-1	1	1	121,594
8.	1	1	1	120,000
9.	-1,682	0	0	64,783
10.	1,682	0	0	56,667
11.	0	1,682	0	27,246
12.	0	1,682	0	134,638
13.	0	0	-1,682	36,667
14.	0	0	1,682	93,333
15.	0	0	0	73,478
16.	0	0	0	59,855
17.	0	0	0	74,638
18.	0	0	0	63,478
19.	0	0	0	64,493
20.	0	0	0	59,565

Tabel 5. ANOVA untuk *Response Surface Quadratic*

Sumber	Sum of Squares	db	Mean Square	Nilai F	p-value Prob>F
Model	17416,7167	6	2902,7861	40,9934	< 0,0001*
X ₁ -Glukosa	14,2274	1	14,2274	0,2009	0,6614
X₂-Yeast extract	12094,0495	1	12094,0495	170,7933	< 0,0001
X₃-Skim milk	4380,0634	1	4380,0634	61,8557	< 0,0001
X ₁ X ₂	96,7864	1	96,7864	1,3668	0,2633
X ₁ X ₃	8,2336	1	8,2336	0,1163	0,7386
X₂X₃	823,3564	1	823,3564	11,6275	0,0047
Residual	920,5434	13	70,8110		
Lack of Fit	702,2524	8	87,7815	2,0106	0,2291**
Pure Error	218,2909	5	43,6582		
Cor Total	18337,2600	19			

Keterangan: Cetak tebal dipergunakan dalam pengembangan model regresi untuk produksi enzim protease
*Signifikan, **Tidak signifikan

Tabel 6. Koefisien regresi dan signifikansi dari model *Response Surface Quadratic*

Faktor	Coefficient Estimate	db	Standard Error	95% CI Rendah	95% CI Tinggi
Intercept	65,9493	1	1,8816	61,8842	70,0143
X ₁ -Glukosa	-1,0207	1	2,2771	-5,9400	3,8986
X ₂ -Yeast extract	29,7585	1	2,2771	24,8392	34,6778
X ₃ -Skim milk	17,9087	1	2,2771	12,9894	22,8280
X ₁ X ₂	3,4783	1	2,9751	-2,9491	9,9056
X ₁ X ₃	-1,0145	1	2,9751	-7,4419	5,4129
X ₂ X ₃	10,1449	1	2,9751	3,7176	16,5723

Konsentrasi glukosa dan *yeast extract* serta interaksinya berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan seperti ditunjukkan pada Gambar 3a. Konsentrasi glukosa dan *skim milk* serta interaksinya berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan seperti ditunjukkan pada Gambar 3b. Demikian pula dengan konsentrasi *yeast extract* khamir dan *skim milk* serta interaksinya yang ditunjukkan pada Gambar 3c juga berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan.

Analisis data optimasi menggunakan *Software Statistic Design-Expert®7 (Stat-Ease, Inc., USA, 2009)* menunjukkan bahwa kondisi optimal untuk produksi enzim protease adalah 0,4% glukosa, 1,5%

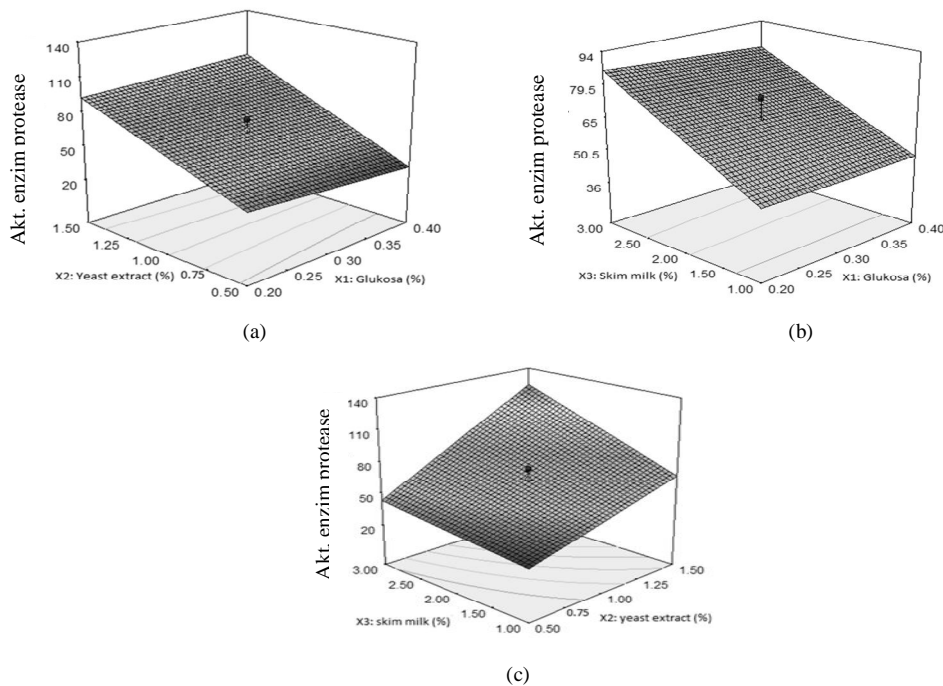
yeast extract dan 3% *skim milk*. Berdasarkan kondisi tersebut, aktivitas enzim protease dapat meningkat yaitu sebesar 125,204 U/mL. Hasil optimasi dapat meningkatkan aktivitas enzim sampai 89,94% jika dibandingkan dengan produksi menggunakan media tanpa optimasi (65,918 U/mL).

Identifikasi Isolate HL.29B.63 Melalui Analisa *Partial Sequence 16s rDNA*

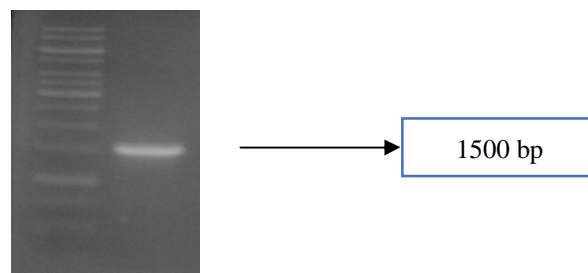
Amplifikasi daerah sebagian gen 16S rDNA menghasilkan produk sekitar 1500 bp (Gambar 4). Hubungan kekerabatan genetik diketahui dengan analisis urutan basa nitrogen gen 16S rRNA. Data hasil urutan (*sequencing*) basa nitrogen isolat dari *IstBASE* dibandingkan

dengan urutan basa nitrogen isolat pembanding yang sama atau memiliki kedekatan kekerabatan melalui metode BLAST (*Basic Local Alligment Sequence Tool*) dari database *genbank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) secara manual. Urutan basa nitrogen dari isolat terpilih dan strain acuan dianalisis menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis6 (MEGA6)* dengan hasil analisis berupa pohon filogenetik (Tamura, *et al.*, 2013). Pohon filogenetik dibentuk

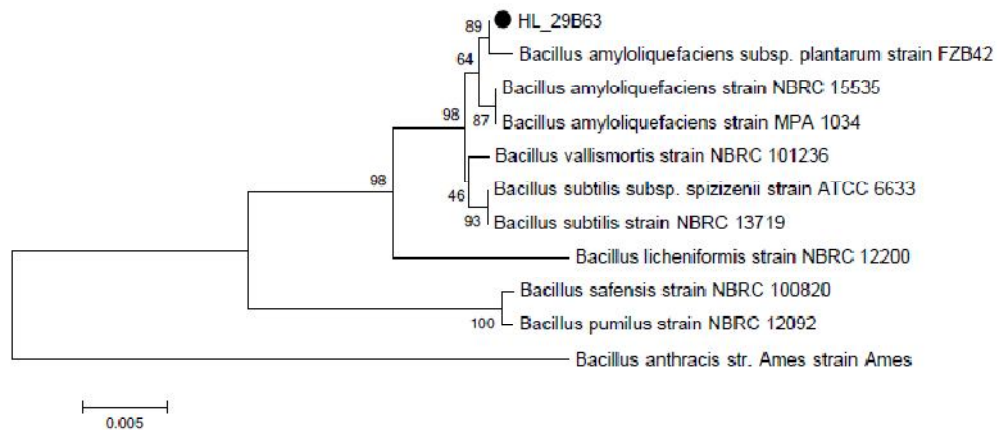
menggunakan metode *neighbour-joining* dan dievaluasi dengan metode *bootstrap* (1000 kali ulangan) sehingga diperoleh pohon filogenetik seperti pada Gambar 5 (Saitou and Nei, 1987; Felsenstein, 1985). Nilai *bootstrap* ditunjukkan pada angka-angka yang terdapat pada cabang-cabang (*node*) pohon filogenetik. Nilai tersebut menunjukkan kekokohan atau ketepatan analisis suatu pohon filogenetik. Isolat HL.29B.63 memiliki kedekatan dengan *B. amyloliquefaciens* subs. *plantarum* strain FZB42 dengan nilai *bootstrap* 89.



Gambar 3. *Response surface plots* bentuk tiga dimensi yang menggambarkan pengaruh konsentrasi *yeast extract* dan glukosa (a), glukosa dan *skim milk* (b) dan *yeast extract* dan *skim milk* (c) terhadap aktivitas enzim protease.



Gambar 4. Analisis sebagian gen 16S rDNA bakteri isolate HL29B63, lane 1 DNA marker 1 Kb, lane 2 produk PCR isolate HL.29B.63



Gambar 5. Hubungan kekerabatan isolat HL.29B.63 dengan beberapa isolat pembanding berdasarkan urutan basa gen 16S rRNA. Pohon filogenetik disusun dengan menggunakan metode Neighbor-Joining. Bootstrapping dilakukan sebanyak 1000 kali pada program MEGA6.06.

4. KESIMPULAN

Bakteri endofit sebanyak delapan puluh enam (86) isolat berpotensi proteolitik. Isolat HL.29B.63 terseleksi sebagai isolat yang menghasilkan enzim protease terbaik. Optimasi medium dapat meningkatkan aktivitas enzim sebesar 89,94% sehingga aktivitas enzim dapat dicapai sebesar 125,204 U/mL. Analisis menggunakan 16s rDNA menunjukkan bahwa isolat HL.29B.63 adalah *Bacillus amyloliquefaciens* subs. *plantaraum* strain FZB42

DAFTAR PUSTAKA

- Adiarti, Retno. (2013). *Aktivitas Bakteri Endofit Batang Mangrove Avicennia marina Sebagai Penghasil Antibiotik*. Skripsi, Pustaka Ilmiah. Penerbit Unpad.
- Arima, K., Yu J., Iwasaki, S. & Tamura, G. (1968). Milk-clotting enzim from microorganism: Purification and crystallization of Mucor rennin from Mucor pusillus var. Lindt. *Applied Microbiology*, 16(11), 1747-1733.
- Fathoni, A., Muhammad, I., Praptiwi, Antonius, H.C. & Andria, A. (2013). Skrining dan isolasi metabolit aktif antibakteri kultur jamur endofit dari tumbuhan *Albertisia papuana* Becc. *Berita Biologi*, 12(3), 307-314.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Gupta, R., Q.K. Beg & P. Lorenz. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 59, 15-32.
- Hanson, R.S. & Philips, J.A. (1981). Manual of methods for general bacteriology. *American Society for Microbiol*, Wanshington DC. p.359-360.
- Joseph, B. & M.R. Priya. (2011). Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. *Am J. Biochem. Mol. Biol.*, 1, 291-309.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M. & Kohno, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cystein proteases in latex. *Plant J.*, 37, 370-378.
- Melliawati, R., Dian, N.W. & Apridah, C.D. (2006). Pengkajian bakteri endofit penghasil senyawa bioaktif untuk proteksi tanaman. *Journal of Biological Diversity*, 7(3), 221-224.
- Melliawati, R. & Harni. (2009). Senyawa antibakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari kapang endofit Taman Nasional Gunung Halimun. *Jurnal Natur Indonesia*, 12(1), 21-27.
- Melliawati, R., Apridah, C.D. & Yopi. (2015). Seleksi bakteri asam laktat sebagai penghasil enzim protease. *Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon.*, 1(2), 184-188.

- Miles, L.A., Lopera, C.A., Gonzales, S., de Garcia, M.C.C., Franco, A.E. & Restrepo, S. (2012). Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *Biocontrol*, 57, 697-710.
- Najafi, M.F. & Deobagkar, D. (2005). Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electron J. Biotechnol.*, 8, 203.
- Naiola, E. & Nunuk, W. (2007). Semi purifikasi dan karakterisasi enzim protease *Bacillus sp.* Berk. Penel. *Hayati*, 13, 51-56.
- Nurhasanah, A. (2010). *Produksi enzim protease dari bakteri Lactobacilli untuk sediaan bahan baku suplemen kesehatan*. <http://km.ristek.go.id/index.php/klasifikasi/detail/20381/>. Diakses tanggal 23 November 2015.
- Rocha, M.V., Romanini, D., Nerli, B.B. & Tubio, G. (2012). Pancreatic serine protease-extraction by affinity partition using a free triazine dye. *Int. J. Biol. Macromol.*, 50, 303-309.
- Rani, K., Rana, R. & Datt, S. (2012). Review on lates overview of proteases. *Int. J. Curr. Lofe Sci.*, 2, 12-18.
- Saran, S., Isar, J. & Saxena, R.K. (2007). A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 70, 697-699.
- Sukara, E. (1987). *Production of single cell protein from cassava by microfungi*. Thesis. Department of Microbiology University of Queensland.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Ueda, M., Kubo, T., Miyatake, K. & Nakamura, T. (2007). Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium sp.* BLB. *App.l Microbiol Biotechnol.*, 74, 331-338.
- Zhang, H.W., Song, Y.C. & Tan, R.X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 753-771.