



Isolasi Bakteri *Indigenous* Penghasil Enzim Protease dari Limbah Cair Industri Tempe

Isolation of Indigenous Bacteria Producing Protease Enzymes from Tempeh Industrial Wastewater

Putri Winahyu*, Ayu Rahmawati Sulistyaningtyas, Sri Darmawati

Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang

Corresponding author: putriwinahyu28@gmail.com*, ayurs@unimus.ac.id,
ciciekdarma@unimus.ac.id

Riwayat Artikel: Dikirim; Diterima; Diterbitkan

Abstrak

Industri tempe merupakan industri skala rumah tangga yang jumlahnya hampir tersebar diseluruh wilayah Indonesia. Sebagian besar industri tempe tersebut masih dikelola secara sederhana. Terutama dalam hal pengolahan limbah. Penggunaan bakteri indigenous yang mampu mendegradasi senyawa organik dalam limbah bisa menjadi salah satu upaya untuk menangani kasus pencemaran lingkungan perairan dengan upaya bioremediasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri indigenous penghasil enzim protease untuk digunakan sebagai agen bioremediasi limbah cair industri tempe. Isolasi sampel limbah cair industri tempe yang diambil dari Desa Sambirejo, Gayamsari, Kota Semarang dimurnikan dengan menggunakan media Nutrient broth (NB), kemudian diinokulasi dan dipurifikasi menggunakan media Nutrient Agar (NA). Koloni yang sudah dimurnikan kemudian dilakukan uji kemampuan bakteri dalam memfermentasi laktosa, menggunakan media Mac Conkey Agar (MC), dan uji kemampuan bakteri dalam menghemolisa sel darah merah menggunakan media Blood Agar Plate (BAP). Uji aktivitas hidrolitik dilakukan menggunakan media selektif yaitu Skim Milk Agar (SMA). Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan, diperoleh 3 isolat yang berbeda yaitu isolat P2, P3, dan P4. Pada uji MC isolat P2 bersifat non laktosa fermenter sedangkan isolat P3 dan P4 bersifat laktosa fermenter. Setelah dilakukan uji BAP didapatkan hasil isolat P2, P3, dan P4 bersifat γ hemolisis. Pada uji aktivitas hidrolitik menggunakan media selektif, diperoleh 2 isolat mampu menghasilkan enzim protease yaitu isolat P2 dan P4. Kesimpulannya, Isolat P4 merupakan isolat yang berpotensi sebagai agen bioremediasi karena mampu menghasilkan zona bening dan tingkat patogenitas rendah.

Kata kunci: Bakteri, bioremediasi, limbah, protease, tempe

Abstract

Industry of Tempeh was a home scale industry which was scattered almost throughout Indonesia. Most of those industries were still be managed in homely. Especially in the case of waste treatment. Using indigenous bacteria which able to degrade organic compounds in waste can be one of the efforts to deal with cases of pollution of the aquatic environment with bioremediation efforts. This study aimed to isolate the indigenous bacteria that produce protease enzymes to be used as a bioremediation agent for tempe industrial wastewater. Isolation of Tempe industry liquid wastewater samples was taken from Sambirejo Village, Gayamsari, Semarang City was purified using Nutrient broth (NB) media, then inoculated and purified using Nutrient Agar (NA) media. Purified colonies were then tested of the ability of the bacteria to ferment lactose using Mac Conkey Agar (MC) media, and the ability of the bacteria to dissolve red blood cells using Blood Agar Plate (BAP) media. The hydrolytic activity test was carried out using selective media namely Skim Milk Agar (SMA). From the results of research that has been done, it obtained 3 different isolates, namely isolates P2, P3 and P4. In the MC test P2 isolates were non-lactose fermenters while isolates P3 and P4 were lactose fermenters. After the BAP test, the results of isolates P2, P3, and P4 were characterized as γ hemolysis. In the hydrolytic activity test using selective media, it obtained 2 isolates that were able to produce protease enzymes namely P2 and P4 isolates. In conclusion, P4 isolate was an isolate that has potential as a bioremediation agent because it is able to produce clear zones and low-pathogenicity

Keywords: Bacteria, bioremediation, protease, waste, tempeh

PENDAHULUAN

Industri tempe telah tersebar di hampir semua daerah di Indonesia. Sebagian besar industri tempe dikelola secara tradisional dan skala rumah tangga. Pengelolaan industri tempe sering menimbulkan permasalahan dalam pembuangan limbah tempe. Pembuangan limbah tempe secara langsung ke perairan dapat menyebabkan pencemaran lingkungan perairan yang cukup serius terutama pada perairan di sekitar industri tempe (Harahap, 2013).



Sebagian besar industri tempe merupakan industri skala rumah tangga yang tidak dilengkapi dengan unit pengolah air limbah. Unit pengolah air limbah hanya dimiliki oleh industri tempe yang tergabung dalam Koperasi Pengusaha Tahu dan Tempe (KOPTI). Berdasarkan keputusan Gubernur Jawa Timur No. 45 Tahun 2002 tentang baku mutu limbah cair industri tempe sebesar BOD (150mg/L), COD (300mg/L), dan TSS (100 mg/L). Sehingga diperlukan adanya upaya pengolahan limbah cair tempe (Ramadhani & Moesriati, 2013).

Bahan baku pembuatan tempe berupa kedelai, proses pengolahannya akan menghasilkan sisa produk yang mengandung senyawa organik. Senyawa organik tersebut antara lain protein, karbohidrat, dan lemak. Dengan adanya kandungan senyawa organik yang tinggi akan mendukung tumbuhnya mikroorganisme (Arifin, 2016). Banyaknya senyawa organik dapat digunakan sebagai nutrisi bagi mikroorganisme dan tingginya kandungan protein dalam limbah, akan mendukung kemampuan mikroorganisme dalam menghasilkan enzim protease.

Beberapa kelompok enzim seperti amilase, xilinase, selulase, dan protease sering digunakan dalam bidang industri. Enzim protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam industri seperti, industri farmasi, kulit, detergen, makanan, dan pengolahan limbah. Protease yang digunakan didalam industri jumlahnya sekitar 60% dari penjualan enzim di dunia. Sedangkan berbagai organisme seperti bakteri, jamur, tanaman dan hewan dapat mengisolasi enzim protease (Fatoni dkk, 2008). Penanganan pencemaran limbah dengan menggunakan kemampuan mikroorganisme untuk memproduksi enzim protease, sehingga senyawa organik kompleks akan terurai menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mudah terlarut dalam air (Sulistyaningtyas dkk, 2018; Sulistyaningtyas & Wilson, 2018).

Berdasarkan alasan tersebut diatas, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui potensi bakteri indigenous penghasil enzim protease dalam mendegradasi senyawa organik dari limbah cair tempe, mengisolasi bakteri dari limbah cair industri tempe penghasil enzim protease, dan untuk menguji aktivitas hidrolitik menggunakan media selektif.

METODE

1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan antara lain ose tanam bulat, ose tanam jarum, cawan petri steril, tabung reaksi, tabung erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, inkubator, mikropipet, pembakar spritus, spatel drygalsky, timbangan analitik, magnetik stirrer, vorteks, autoklaf, oven, batang pengaduk, plastic wrap, kapas, kain kasa steril, alumunium foil, mikrotip, mikroskop.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Nutrient agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Skim Milk Agar* (SMA), NaCl fisiologis, cat Gram, *aquadest*, alkohol.

2. Prosedur Penelitian

a. Koleksi Sampel

Sampel penelitian ini adalah limbah cair industri tempe yang diperoleh dari Desa Sambirejo, Gayamsari, Kota Semarang. Limbah cair yang digunakan masih segar dengan warna putih keruh dan berbau.

b. Preparasi sampel

Sampel limbah diambil secara langsung dari tempat buangan pertama limbah, kemudian sampel ditempatkan pada wadah tertutup ukuran 140 ml.

c. Isolasi Mikroorganisme

Tahap pertama yang dilakukan adalah mengisolasi bakteri pendegradasi senyawa organik dari limbah cair tempe dengan menggunakan metode seri pengenceran. Pengenceran dilakukan dengan menyiapkan 5 tabung pengencer yang diisi NaCl fisiologis masing-masing tabung sebanyak 9 ml, lalu tabung reaksi diberi label pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Sampel dipipet sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} dan dihomogenkan, kemudian dari tabung pengenceran 10^{-1} diambil sampel sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung [engenceran 10^{-2} . Pengenceran dilakukan secara bertingkat hingga 10^{-5} .

Sampel hasil pengenceran selanjutnya dikultur pada media *Nutrient Broth* (NB) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah dilakukan pemurnian bakteri pada tahap pertama,



kemudian dilakukan subkultur tahap kedua menggunakan medium *Nutrient Agar* (NA) dengan cara diambil 1 ml dan diinokulasikan pada medium NA menggunakan teknik spread plate secara aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipurifikasi supaya didapatkan isolat murni. Koloni yang tumbuh diamati secara makroskopis meliputi bentuk, ukuran, tekstur, dan warna. Berdasarkan perbedaan penampilan koloni lalu dilakukan tahap pemurnian sehingga akan diperoleh sejumlah isolat. Koloni murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya (Darmayasa, 2008).

d. Purifikasi Mikroorganisme

Setelah dilakukan pemurnian bakteri pada tahap pertama, kemudian bakteri hasil inokulasi dari media NA dilakukan purifikasi menggunakan metode streak 16 gores dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dipurifikasi dengan tujuan supaya didapatkan isolat murni. Koloni yang tumbuh diamati secara makroskopis meliputi bentuk, ukuran, tekstur, dan warna. Setelah proses purifikasi akan didapatkan perbedaan penampilan koloni sehingga akan diperoleh sejumlah isolat. Koloni murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya (Darmayasa, 2008).

e. Seleksi Mikroorganisme

i. Pengamatan Morfologi

Identifikasi ini meliputi karakterisasi morfologi dan karakterisasi fisiologi. Bakteri murni dari isolat terpilih yang ditumbuhkan selama 24 jam. Karakterisasi secara mikroskopis meliputi warna koloni dan bentuk koloni sedangkan secara makroskopis dengan melihat morfologi sel dan warna. Bakteri Gram-positif akan berwarna biru keunguan, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Latsir, 2014).

ii. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui bentuk dan keseragaman sel (Darmawati dkk, 2014; Darmawati dkk, 2015). Isolat diremajakan dalam media *Nutrien Agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Kemudian, dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui morfologi koloni. Kemudian ambil akuades ditetaskan pada kaca objek ditambahkan 1 ose biakan sampel. Lalu difiksasi diatas api. Tetesi pewarnaan kristal violet dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir, kemudian tetesilugol biarkan satu menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya tetesi alkohol 96 % biarkan selama 10-20 detik, cuci dengan air mengalir dan tambahkan safranin biarkan selama 20-30 detik kemudian cuci lagi dengan menggunakan kertas serap dan tambahkan minyak imersi dan amati dibawah mikroskop. Bila pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri Gram-negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut merupakan bakteri Gram-positif (Fitri dkk, 2011).

f. Uji Kemampuan Bakteri dalam Memfermentasi Laktosa dan Menghemolisa Sel Darah Merah

. Adanya garam empedu pada media MC berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif khususnya famili Enterobacteriaceae. Selain menggunakan media MC, pengujian patogenitas suatu bakteri juga bisa menggunakan medium *Blood Agar Plate* (BAP) atau media agar darah. Dalam uji patogenitas ini dapat diketahui kemampuan bakteri dalam menghemolisis sel darah merah yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni. Mikroorganisme yang bersifat patogen, ditunjukkan dengan kemampuannya yang dapat menghemolisis del darah merah (Muslikhah, 2014). Koloni bakteri hasil purifikasi diinokulasikan kedalam media MC Agar dan BAP lalu diinkubasi 1x24 jam pada suhu 37° C. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian diamati (Pamungkas dkk., 2018).

g. Uji Aktivitas Hidrolitik Menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA)

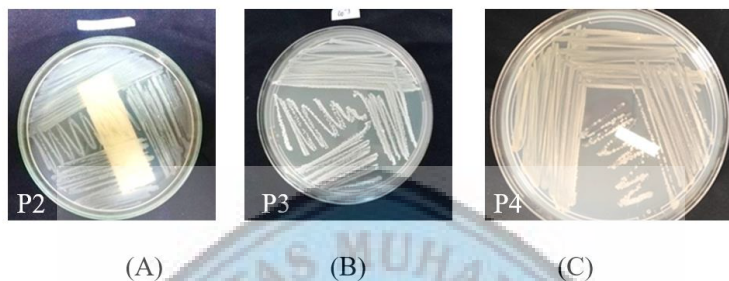
Pengujian potensi bakteri proteolitik dilakukan dengan cara isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Skim Milk Agar* dengan metode dotting. Setelah diinkubasi 1x24 jam pada suhu 37° C, disekitar isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease akan terlihat zona bening (Zahidah dkk., 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel limbah cair dari industri tempe yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari satu titik lokasi pembuangan limbah yang berada di Desa Sambirejo, Gayamsari, Kota Semarang.

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Hasil Isolasi

| Nama Sampel | Diameter (cm) | Warna | Bentuk Koloni | Tepi | Elevasi | Konsistensi | Kode |
|-------------|---------------|-------------|---------------|----------|---------|-------------|--------------------|
| P2 | 0,1 | putih keruh | Round | Undulate | Flat | Smooth | P.10 ⁻² |
| P3 | 0,1 | putih keruh | Round | Entire | Convex | Smooth | P.10 ⁻³ |
| P4 | 0,4 | Kuning | Round | Undulate | Flat | Rough | P.10 ⁻⁴ |



Gambar 1. Hasil Purifikasi Mikroorganisme. A: Isolat pengenceran 10⁻², B: Isolat pengenceran 10⁻³, C: Isolat pengenceran 10⁻⁴

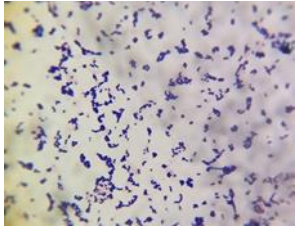
Berdasarkan hasil isolasi limbah cair industri tempe yang telah dilakukan, diperoleh hasil koloni dari purifikasi 1 sampai purifikasi ke 3, didapatkan 3 koloni berbeda. Pada isolat P2 diperoleh karakteristik koloni dengan ukuran: 0,1 cm, bentuk: *round*, tepi: *undulate*, elevasi: *flat*, dan konsistensi: *Smooth*. Pada isolat P3 diperoleh karakteristik koloni dengan ukuran: 0,1 cm, bentuk: *round*, warna: putih keruh, tepi: *conve*, dan konsistensi *smooth*. Pada isolat P4 diperoleh karakteristik koloni dengan ukuran 0,4 cm. Bentuk: *round*, warna: kuning, tepi: *undulate*, elevasi: *flat*, dan konsistensi: *smooth*.

Pengecatan Gram pada setiap koloni bakteri hasil purifikasi bertujuan untuk mengetahui bentuk dan keseragaman sel (Darmawati dkk; 2014; Darmawati dkk; 2015). Bila pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri Gram-negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut merupakan bakteri Gram-positif (Fitri dkk, 2011).

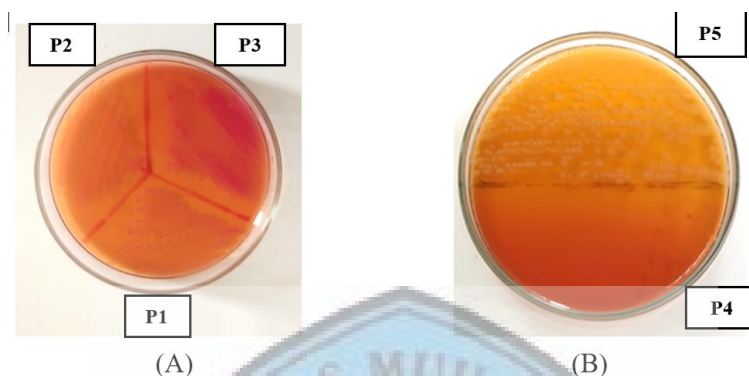
Tabel 2. Hasil Pengecatan Gram Isolat Bakteri

| Isolat | Susunan | | |
|--------|-------------|--|---------|
| | | | Negatif |
| | Bergerombol | | Negatif |



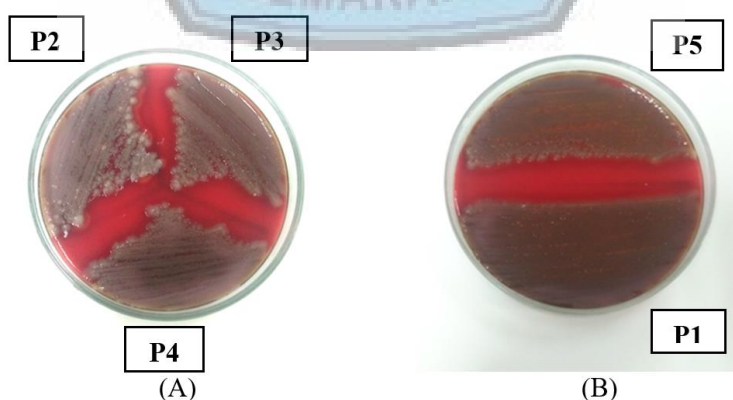
| | | | | |
|---|--|--|---------|--|
|  | | | Positif | |
|---|--|--|---------|--|

Dari proses pengecatan Gram isolat bakteri, diperoleh hasil isolat Isolat P2: menghasilkan bakteri bersifat Gram-positif karena bakteri terwarnai ungu. Isolat P3: menghasilkan bakteri yang bersifat Gram-positif karena bakteri terwarnai ungu. Isolat P4: menghasilkan bakteri yang bersifat Gram-positif, karena bakteri terwarnai ungu.



Gambar 2. Hasil uji patogenitas di media MC. A:

Sifat selektif yang dimiliki media MacConkey Agar yaitu adanya garam empedu yang merupakan penghambat untuk sebagian besar bakteri Gram-positif. Merah netral adalah indikator pH yang berwarna merah pada pH di bawah 6,8 dan tidak berwarna pada pH lebih besar dari 6,8 (Aryal, 2018). Pengujian tingkat patogenitas suatu bakteri juga dapat menggunakan medium Blood Agar Plate (BAP) atau media agar darah. Dalam uji patogenitas ini dapat diketahui kemampuan bakteri dalam menghemolisis sel darah merah yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni. Mikroorganisme yang bersifat patogen, ditunjukkan dengan kemampuannya yang dapat menghemolisis sel darah merah (Muslikhah, 2014). Koloni bakteri hasil purifikasi diinokulasikan ke dalam media MC Agar dan BAP lalu diinkubasi 1x24 jam pada suhu 37° C. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian diamati (Pamungkas dkk, 2018).



Gambar 3. Hasil Uji patogenitas pada media BAP. A: Isolat pengenceran 10^{-1} = β hemolisis 10^{-2} , 10^{-3} = γ hemolisis. B: Isolat pengenceran 10^{-4} = γ hemolisis, 10^{-5} : α hemolisis

Dalam uji tingkat patogenitas ini dapat diketahui kemampuan bakteri dalam menghemolisis sel darah merah yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni. Mikroorganisme yang bersifat patogen, ditunjukkan dengan kemampuannya yang dapat menghemolisis sel darah merah (Muslikhah, 2014)

Tabel 2. Hasil Uji Patogenitas Bakteri Pada Media MC dan BAP

| Isolat | Media MC Agar | Media BAP | Kode |
|--------|--------------------------|------------------------------|-------------|
| P2 | Laktosa fermenter Lambat | Gamma hemolisis (γ) | $P.10^{-2}$ |
| P3 | Laktosa fermenter | Gamma hemolisis (γ) | $P.10^{-3}$ |
| P4 | Laktosa Fermenter | Gamma hemolisis (γ) | $P.10^{-4}$ |

Setelah melalui uji patogenitas bakteri, diketahui isolat P2, P3, dan P4 menunjukkan hasil γ hemolisis. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat tersebut bersifat non patogen berdasarkan uji BAP. Setelah melalui uji patogenitas bakteri menggunakan media MC, diketahui isolat P2 mempunyai sifat laktosa fermenter lambat. Sedangkan pada isolat P3 dan P4 mempunyai sifat laktosa fermenter pada media MC. Hal ini menunjukkan bahwa isolat P2 memiliki tingkat patogenitas rendah sedangkan isolat P3 dan P4 tidak patogen. Koloni bakteri yang mampu memfermentasi laktosa berwarna merah muda hingga warna merah seperti bunga mawar serta berbagai pewarnaan yang mitip. Sedangkan koloni bakteri yang tidak bisa memfermentasi laktosa tidak berwarna sehingga tampak kontras dengan latar media yang berwarna merah muda (Sari, dkk 2014).

Pengujian potensi bakteri proteolitik dilakukan dengan cara isolat bakteri ditumbuhkan pada medium *Skim Milk Agar* disekitar isolat bakteri yang memiliki aktivitas protease akan terlihat zona bening (Zahidah dkk, 2018). Hasil uji enzim protease masing-masing isolate koloni bakteri P2, P3 dan P4 ditunjukkan pada Gambar 4 berikut ini



Gambar 4. Hasil Uji Enzim protease isolat P2 dan P4 berupa terbentuknya zona bening di sekitar isolat.

Berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media SMA, isolat P2 memiliki diameter zona bening 2,43 cm, isolat P3 tidak dapat menghasilkan zona bening, dan isolat P4 mampu menghasilkan zona bening dengan diameter 1,17 cm. Dengan demikian, maka isolat P2 dan P4 menunjukkan kemampuan dalam menghasilkan enzim protease

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, sampel limbah cair dari industri tempe dapat diperoleh 3 isolat bakteri dengan bentuk koloni yang berbeda. yaitu isolat P2, P3, dan P4. Dari 3 isolat bakteri yang diperoleh menunjukkan isolat P2 dan P4 mampu menghasilkan zona bening disekitar koloni. Isolat P4 merupakan isolat yang mampu menghasilkan enzim protease dan berpotensi dalam agen bioremediasi. Karena isolat tersebut mampu menghasilkan zona bening disekitar koloni dan merupakan isolat yang tidak bisa menghemolisa sel darah manusia atau γ hemolisa.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, W., 2016. Rancang bangun Alat Konvensi Biogas Limbah Cair tempe dan Pengujian Dengan Penambahan variasi Campuran sekam Padi. Skripsi, Fakultas teknik Universitas Muhammadiyah Surakarta.



- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W. And Artama, W.T., 2015. Identifikasi bakteri batang Gram negatif pada darah widal positif berdasarkan karakter fenotipik.
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W., artama, W.T. and Kawaichi, M., 2014. Phylogenetic relationship of Gram Negative Bacteria of Enterobacteriace Family in the Positive Widal Blood Cultures based on 16S rRNA Gene Sequences. Indonesian Journal of Biotechnology, 19(1), pp.64-70
- Fatoni, A., Zufakir, Lestari. P., 2008. Isolasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri Limbah Cair Tahu. 10(2). 83-88.
- Fitri, L. & Yasmin, Y., 2011. Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. 3(2). 20-25.
- Harahap, S., 2013. Pencemaran perairan Akibat Kadar Amoniak Yang Tinggi Dari Limbah Cair Industri Tahu. 4(2). 183-194.
- Muslikhah., 2014. Uji Mikrobiologis Paru-paru Sapi dari Tempat Pemotongan hewan (TPH) di Kota Gorontalo
- Pamungkas, N., Firmansyah, A., Ethica., 2018. Isolasi dan Uji Patogenitas Bakteri Indigen Penghasil enzim Protease dari Limbah Ampas Kelapa di Pasar Tradisional Ngawen untuk Bioremediasi. 1. 2654-766X.
- Ramadhani, G. I., & Moesriati., A., 2013. Pemanfaatan Biji Asam jawa (Tamarindusindica) Sebagai Koagulan Alternatif dalam Proses Menurunkan Kadar BOD dan COD dengan Studi Kasus Pada LimbaCair Industri Tempe. 2(1). 2301-9271.
- Sulistyaningtyas, A. R., Prihastanti, E., and Hastuti, E. D. 2018. Potential of liquid tofu waste for decaffeination of Robusta coffee (Coffea robusta Lindl. Ex De Will). Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences, 8(1).
- Sulistyaningtyas, A. R., and Wilson, W. 2018. The Potential of Liquid Tofu Waste in Increasing Antioxidant Activity of Robusta Green Coffee. Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education, 10(2), 356-361.