

POTENSI LIMBAH AIR TAHU ASAL KOTA MAROS SEBAGAI SUMBER BAKTERI PENGHASIL ENZIM PROTEASE DALAM MELAWAN RADIKAL BEBAS

Fitriana, Amirullah, Nurul Ilmy, Dyah Nur Pratiwi, Andi Adela resmilasari,
Nabila Adelina HM

Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia Makassar
Email : fitriana.fitriana@umi.ac.id

ABSTRACT

This research aims to determine the protease enzyme-producing bacteria in Limbah Air Tahu and IC_{50} fermentat protease enzyme-producing bacteria in Limbah Air Tahu potentially fight free radicals. The methods in the study, which is taking Limbah Air Tahu and sewage treatment, followed by isolation of the bacteria producing the enzyme protease. Bacterial isolates obtained purified, for macroscopic examination. Fermentation bacteria and the production of protease enzymes. Purified protease enzyme obtained. Testing fermentat to fight free radicals with the DPP method and the determination of IC_{50} values fermentat protease enzyme-producing bacteria. The results of the protease enzyme producing bacteria identification on Biochemical activity test, there were 7 positive bacteria. The results of screening anti-free radical activity against isolates obtained 12 isolates with code FF 05. UMI IBPLT most excellent activity that is obtained of the IC_{50} fermentat isolates UMI IBPLT FF 05 is equal to 0.129 and dibandingkan dengan IC_{50} Vitamin C is = 14.81 + 0:10 then isolates FF 05 UMI IBPLT active in fighting free radicals.

Keywords : Limbah air tahu, protease enzyme, bacteria isolation, IC_{50} , free radicals.

PENDAHULUAN

Industri tahu merupakan industri pangan yang populer dimasyarakat, bahan bakunya banyak dijumpai, pengolahannya mudah, bergizi, dan harganya terjangkau. Dampak positif industri tahu yang lain adalah terserapnya tenaga kerja, terpenuhinya gizi masyarakat, dan peningkatan pendapatan masyarakat. Namun demikian, muncul pula dampak

negatif yaitu polusi lingkungan karena limbah tahu yang kaya bahan organik dan potensial terjadi degradasi secara alami.¹

Menurut Rahardjo dalam Trismilah *et al.* (2001) limbah cair dari tahu mengandung bahan organik dan nutrisi tinggi yang terdiri dari air 90,72 %, protein 1,8%, lemak 1,2%, serat kasar 7,36%, dan abu 0,32 %. Limbah cair dari tahu yang paling berbahaya

apabila dibuang secara langsung ke lingkungan adalah whey yang merupakan hasil samping proses penggumpalan dan kandungan bahan organiknya sangat tinggi.¹

Mikroorganisme merupakan salah satu sumber penghasil enzim yang memiliki nilai ekonomi penting dan banyak digunakan dalam industri sekarang ini. Oleh karena itu pencarian mikroba yang mampu menghasilkan enzim-enzim komersial perlu diupayakan. Pendekatan yang dapat diupayakan untuk mengeksplorasi mikroba penghasil enzim komersial adalah dengan cara mengisolasi dan menskrining mikroba dari alam kemudian mempelajari beberapa pengaruh terhadap produksi enzim seperti komposisi medium, pH, suhu, variasi konsentrasi substrat dan waktu fermentasi.²

Enzim protease mengacu pada sekelompok enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis protein. Enzim protease juga disebut dengan enzim proteolitik atau proteinase. Protease menguraikan protein menjadi molekul yang lebih kecil, dimana setiap enzim protease memiliki kemampuan berbeda dalam menghidrolisis ikatan peptide.³

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif karena memiliki

elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya sehingga dapat bereaksi dengan molekul sel tubuh dengan cara mengikat elektron sel tersebut, dan mengakibatkan reaksi berantai yang menghasilkan radikal bebas baru.⁴

Antioksidan bereaksi dengan radikal bebas dengan cara mengurangi konsentrasi oksigen, mencegah pembentukan singlet oksigen yang reaktif, mencegah inisiasi rantai pertama dengan menangkap radikal primer seperti radikal hidroksil, mengikat katalis ion logam, mendekomposisi produk-produk primer radikal menjadi senyawa non-radikal, dan memutus rantai hidroperoksida.⁵

Hal inilah yang mendasari perlunya dilakukan penelitian tentang pemanfaatan limbah air tahu asal Kabupaten Maros yang berpotensi sebagai sumber bakteri penghasil enzim protease dalam melawan radikal bebas.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan otoklaf (Smic model YX-280 B), bejana maserasi, cawan petri (Iwaki Pyrex), Inkubator (Memmert), Laminar Air Flow (LAF), lampu spiritus, mikroskop, oven (Fisher), pH meter, pipet mikro,

Potensi limbah air tahu asal kota maros sebagai sumber bakteri penghasil enzim protease dalam melawan radikal bebas

spektrofotometer UV-VI0zS, shaker, dan timbangan analitik.

Bahan yang digunakan yaitu Limbah air tahu dari industri tahu di Kabupaten Maros. Medium NA (Nutrient Agar), NB (Nutrient Broth) dan SMA (skim milk 100 g, agar 15 g, akuades 1 l) dan alkohol 70%.

Prosedur kerja

Isolasi bakteri penghasil protease.

Sampel limbah air tahu diinokulasikan ke dalam medium NB, dan diinkubasi 48 jam pada kondisi yang sesuai habitat asal. Sebanyak 0,1 mL sampel dari medium pengayaan ditumbuhkan secara sebaran pada medium NA dan diinkubasi 48 jam. Dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada medium NA yang menunjukkan perbedaan ditumbuhkan pada medium NA secara goresan dan diinkubasi pada suhu sesuai habitat asal selama 48 jam untuk mendapatkan isolat murni.

Penapisan kualitatif kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim protease.

Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein ditandai dengan pembentukan zona jernih. Caranya satu ose koloni digoreskan pada medium SMA. Piaraan diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan habitat asal

selama 48 jam dan diamati terbentuknya zona jernih pada masing-masing koloni. Koloni yang membentuk zona jernih merupakan penghasil protease dan digunakan untuk penelitian selanjutnya meliputi identifikasi dan produksi ekstrak enzim kasar protease.

Identifikasi bakteri

Uji biokimia dan uji morfologi (pengamatan sel) dilakukan untuk identifikasi bakteri. Uji biokimia meliputi uji katalase, uji oksidase, dan uji reduksi nitrat. Bakteri ditumbuhkan dalam medium tumbuh untuk mengetahui jenis bakteri tersebut. Bakteri selanjutnya diidentifikasi melalui serangkaian uji biokimiawi dan uji morfologi. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia.

Pembuatan inokulum.

Inokulum dibuat dengan cara memindahkan 1 ose bakteri yang telah diremajakan ke dalam 25 mL medium inokulum (NB), kemudian dikocok dengan alat pengocok horizontal (Kotterman) skala 8 selama 24 jam.

Produksi Enzim Protease

Produksi protease dilakukan dengan cara memindahkan 5% (v/v) inokulum ke dalam 300 mL medium produksi (NB). Medium produksi selanjutnya diinkubasi

Potensi limbah air tahu asal kota maros sebagai sumber bakteri penghasil enzim protease dalam melawan radikal bebas

selama waktu produksi optimum pada suhu kamar.

Uji Aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DDPH seperti yang dilakukan oleh Othman et al., (2007) yang dimodifikasi, yaitu : Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 5 mg/mL; 1,25 mg/l; 0,5 mg/l; 0,1 mg/l; dan 0,01 mg/l dalam etanol absolut. Sebanyak 100 mL larutan uji ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM dan etanol hingga 5 mL. Campuran selanjutnya

divortex dan dibiarkan selama 30 menit . Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuenran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin C.

IC₅₀ dihitung dengan memplot grafik aktivitas *scavenging* dengan konsentrasi fermentat, yang didefinisikan sebagai total antioksidan yang dibutuhkan untuk menurunkan konsentrasi DPPH sampai konsentrasi 50 %.

HASIL PENELITIAN

Hasil Pengujian isolat bakteri penghasil enzim protease.

Tabel 1. Hasil Uji Bakteri Penghasil Enzim Protease dari Libah air Tahu Asal Kabupaten Maros.

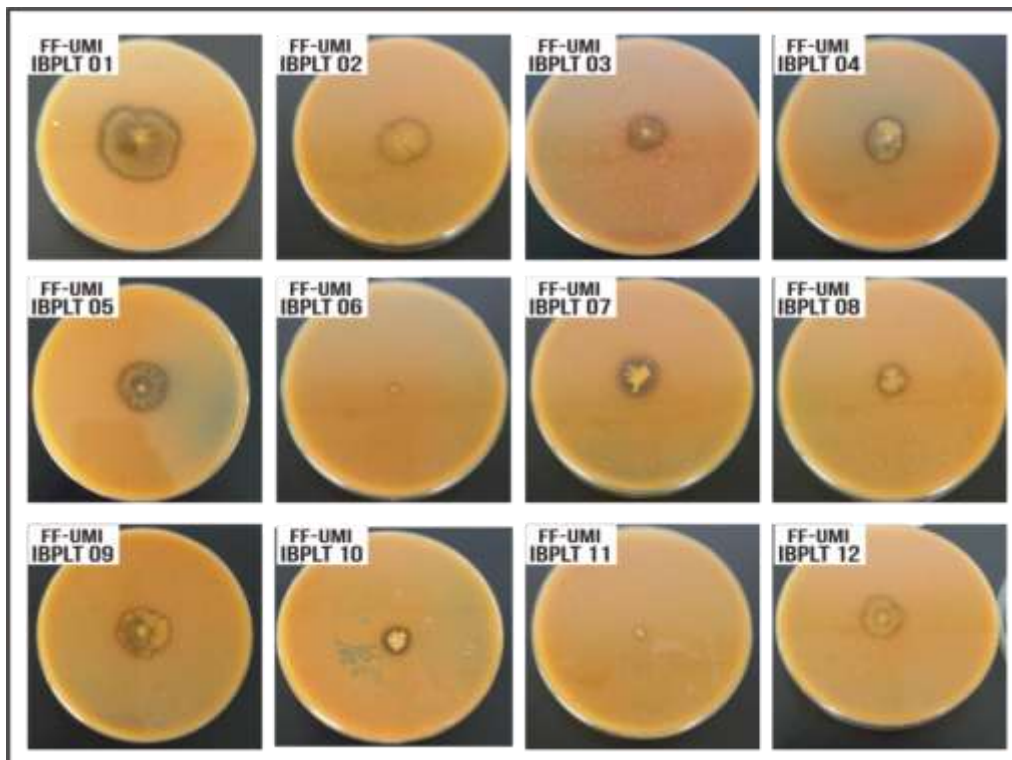
Isolat	Diameter (mm)			Rata-Rata
	R1	R2	R3	
FF UMI IBPLT 01	37	35	4	37,3
FF UMI IBPLT 02	23	20	2,3	22
FF UMI IBPLT 03	15	17	1,5	15,6
FF UMI IBPLT 04	17	20	1,3	16,6
FF UMI IBPLT 05	24	24	2,3	23,6
FF UMI IBPLT 06	7	7	8	7,6
FF UMI IBPLT 07	18	18	1,9	8,6
FF UMI IBPLT 08	17	18	18	17,3
FF UMI IBPLT 09	25	22	24	23,6
FF UMI IBPLT 10	14	15	1,4	14,6
FF UMI IBPLT 11	7	8	8	7,6
FF UMI IBPLT 12	13	12	14	13

Potensi limbah air tahu asal kota maros sebagai sumber bakteri penghasil enzim protease dalam melawan radikal bebas

Hasil Pengujian biokimia isolat bakteri penghasil enzim protease

Tabel 2. Hasil Pengujian biokimia isolat Bakteri Penghasil Enzim Protease dari Limbah air Tahu Asal Kabupaten Maros.

Isolat	Oksidasi	Katalase	Sitrat
FF UMI IBPLT 01	+	+	+
FF UMI IBPLT 02	+	+	-
FF UMI IBPLT 03	+	-	-
FF UMI IBPLT 04	+	+	+
FF UMI IBPLT 05	+	-	+
FF UMI IBPLT 06	+	+	+
FF UMI IBPLT 07	+	-	+
FF UMI IBPLT 08	+	+	+
FF UMI IBPLT 09	+	+	-
FF UMI IBPLT 10	+	-	+
FF UMI IBPLT 11	+	-	-
FF UMI IBPLT 12	+	+	-



Gambar 1. Foto Hasil Pengujian Bakteri Penghasil Enzim Protease dari Limbah air Tahu Asal Kabupaten Maros pada medium Skim Milk Agar (SMA).

Potensi limbah air tahu asal kota maros sebagai sumber bakteri penghasil enzim protease dalam melawan radikal bebas

Perhitungan IC₅₀ Fermentat Isolat Bakteri FF UMI IBPLT 05

$$\% \text{ Inhibisi} : \frac{(\text{Abs. Kontrol} - \text{Abs. Sampel})}{\text{Abs. Kontrol}} \times 100 \%$$

Absorban Kontrol DPPH 50 uM = 0,692

Konsentrasi (ug /mL)	Absorbansi (Rata Rata)	% Inhibisi	IC ₅₀	Aktivitas Antioksidan
0,5	0,377	45,52		
1	0,485	29,91		
1,5	0,575	16,90	0,129	Aktif
2	0,612	11,56		
2,5	0,677	2,16		

Perhitungan IC₅₀ Fermentat

$$Y = a + bx \quad \text{Dimana : } y = \% \text{Inhibisi (50)}$$

a = Intercept (Perpotongan garis di sumbu y)

b = Slope (Kemiringan)

x = Konsentrasi

$$a = 52,731; b = -21,014; r = -0,983$$

$$50 = 52,731 + (21,014) x$$

$$X = \frac{50 - 52,731}{-21,014}$$

$$= \frac{-2,731}{-21,014}$$

$$= 0,129 \text{ ppm}$$

$$= 0,129 \text{ ppm}$$

$$= 0,129 \text{ ppm}$$

IC₅₀ Vitamin C sebagai pembanding = 14,81±0.10

PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri proteolitik sebagai penghasil enzim protease dari Limbah air tahu asal Kabupaten Maros di peroleh 12 isolat yang memiliki aktivitas sebagai penghasil enzim protease yang ditandai dengan adanya zona bening disekitar pertumbuhan koloni bakteri pada saat proses isolasi yang kemudian diberi kode FF UMI IBPLT 01, FF UMI IBPLT 02, FF UMI IBPLT 03, FF UMI IBPLT 04, FF UMI IBPLT 05, FF UMI IBPLT 06, FF UMI IBPLT 07, FF UMI IBPLT 08, FF UMI IBPLT 09, FF UMI IBPLT 10, FF UMI IBPLT 11 dan FF UMI IBPLT 12.

Pada tahap penentuan bakteri dalam menghasilkan enzim protease dimana ditandai dengan kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein ditandai dengan

Uji daya hambat ekstrak etil asetat daun binahong (Anredera colifloria (Ten.) Steenis) terhadap pertumbuhan bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.

pembentukan zona jernih. Koloni yang membentuk zona jernih merupakan penghasil protease dan diperoleh besar zona hambat yang berbeda beda dari ke 12 isolat tersebut.

Untuk tahap identifikasi bakteri penghasil enzim protease pada pengujian aktivitas Biokimia terdapat 7 Bakteri positif untuk uji sitrat yang ditandai dengan terjadinya perubahan medium SCA dari hijau ke biru yang berarti bakteri tersebut mampu menghidrolisis urea, sedangkan untuk uji katalase dengan melihat adanya gelembung pada saat penambahan prekursor H_2O_2 diperoleh 7 isolat. Dan untuk uji oksidasi untuk melihat bentuk pertumbuhan dari bakteri penghasil enzim protease diperoleh 12 isolat bakteri positif pada pengujian oksidasi.

Pada pengujian produksi enzim protease yaitu dilakukan produksi enzim dengan memproduksi enzim protease kemudian dilanjutkan dengan skrining anti radikal bebas menggunakan larutan DPPH terhadap ke 12 isolat bakteri penghasil enzim protease, dengan penambahan larutan DPPH dan dilihat isolat mana yang memberikan aktivitas yang paling baik yang ditandai dengan isolat yang paling lama memberikan perubahan warna menjadi warna ungu. Dan hasil yang diperoleh adalah isolat FF UMI IBPLT 05 dan isolat FF UMI IBPLT 09 yaitu dengan penambahan larutan DPPH sebanyak 1,5 mL sampai terjadi perubahan dan yang memberikan aktivitas yang paling baik. Kemudian setelah dibandingkan antara isolat FF UMI IBPLT 05 dan isolat FF UMI IBPLT 09 ternyata yang memberikan aktivitas paling baik adalah isolat FF UMI IBPLT 05 dengan volume yang lebih besar yaitu 1,75 mL yang nantinya akan dilanjutkan untuk penentuan IC_{50} .

Pada pengujian penentuan IC_{50} terhadap isolat FF UMI IBPLT 05 dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dimana hasil yang memberikan aktivitas yang paling baik yaitu diperoleh Besar IC_{50} fermentat isolat FF UMI IBPLT 05 yaitu sebesar 0,129 dan dibandingkan dengan IC_{50} Vitamin C yaitu = $14,81+0.10$ maka isolat FF UMI IBPLT 05 aktif dalam melawan radikal bebas.

KESIMPULAN

Limbah Air tahu asal Kabupaten Maros mengandung bakteri penghasil enzim protease yang berpotensi melawan radikal bebas. Besar IC_{50} fermentat isolat FF UMI IBPLT 05 yaitu sebesar 0,129 dan dibandingkan dengan IC_{50} Vitamin C yaitu = $14,81+0.10$ dan isolat FF UMI IBPLT 05 aktif dalam melawan radikal bebas.

DAFTAR PUSTAKA

Uji daya hambat ekstrak etil asetat daun binahong (Anredera colifolia (Ten.) Steenis) terhadap pertumbuhan bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.

1. Suryandono AG. Identifikasi Laju Produksi Biogas pada Pengolahan Limbah Cair Tahu Menggunakan Anaerobic Baffled Reactor (ABR). Yogyakarta : Jurusan TIP FTP UGM, 2004.
2. Ohno T, Arman S, Hatta T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T., A modular Family 19 Chitinase 9 Found In The Prokaryotic Organism *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 1996; 178: 5065–5070.
3. Rahayu S., Karakteristik Biokimiawi Enzim Termotabil Penghidrolisis Kitin (Disertasi). Bogor : Sekolah Pasca Sarjana , Institut Pertanian Bogor, 2004.
4. Ketaren S. Teknologi Pengolahan Minyak dan Lemak Pangan. Jakarta : UI-Press, 1986.
5. Shahidi F. Natural Antioxidans (Chemistry, Health Effects, and Applications) AOAC. Illino : Press Champaign, 1997.