

Bakteri Basil Berendospora Asal Tanah Penghasil Protease

Soil-Derived Endospore-Forming Bacillus Bacteria Producing Protease

Mazidah Noer Inayah^{1*}, Suci Indah Budiarti², Rizal Khoirun Alfisah³

^{1,2}Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Yakpermas Banyumas
Jl. Raya Jompo Kulon, Sokaraja, Banyumas, 53181, Indonesia

³Program Studi Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman
Jl. Profesor Dr. Soeparno No. 63, Purwokerto Utara, 53123, Indonesia

*Corresponding author: mazidahni@gmail.com

ABSTRAK

DOI:
[10.30595/jrst.v9i2.26600](https://doi.org/10.30595/jrst.v9i2.26600)

Histori Artikel:

Diajukan:
19/05/2025

Diterima:
21/08/2025

Diterbitkan:
08/09/2025

Luasnya aplikasi protease dalam berbagai bidang seperti industri pangan, farmasi, tekstil, deterjen, hingga pengolahan limbah mendorong penelitian untuk menemukan sumber-sumber baru enzim tersebut. Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah eksplorasi dan isolasi bakteri proteolitik potensial dari tanah. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri potensial yang diharapkan mampu menghasilkan protease dengan karakteristik unggul. Metode isolasi bakteri proteolitik dari sampel tanah dilakukan dengan menggunakan media selektif *skim milk agar* dengan teknik cawan sebar (*spread plate*). Diikuti dengan uji aktivitas protease secara kualitatif berdasarkan pembentukan zona bening dan perhitungan indeks proteolitik. Aktivitas protease juga ditentukan secara kuantitatif dengan substrat yang digunakan adalah kasein 1% yang dilarutkan dalam bufer tris-HCl 0.2 M pada pH 7.5. Standar yang digunakan adalah asam amino tirosin. Pengukuran aktivitas protease secara kuantitatif dilakukan bersamaan dengan penentuan kurva pertumbuhan bakteri. Penelitian ini, berhasil mengisolasi bakteri proteolitik P02 yang memiliki indeks proteolitik 0.8 ± 0.1 dan aktivitas enzim protease sebesar 0.867 U/mL. Aktivitas protease tertinggi dicapai pada saat pertumbuhan bakteri berada dalam fase logaritmik. Isolat bakteri proteolitik P02 memiliki morfologi sel berbentuk batang (basil), Gram positif, dan mampu membentuk endospora. Berdasarkan hasil uji fisiologis biokimia, isolat bakteri proteolitik P02 diduga merupakan genus *Bacillus* sp. Isolat proteolitik P02 berpotensi menjadi sumber protease yang banyak dimanfaatkan dalam bidang industri dan bioteknologi serta bersifat ramah lingkungan dan berkelanjutan.

Kata Kunci: Bakteri Tanah; Enzim; Mikroba Potensial; Protease; Proteolitik

ABSTRACT

Proteases are widely utilized in many industries, including waste treatment, textiles, detergents, food processing, and medicines. This encourages researchers to discover novel sources of these enzymes. Exploration and isolation of putative proteolytic bacteria from the soil is one promising approach. The purpose of this study is expected providing the bacterial isolates that will produce superior proteases. Proteolytic bacteria were isolated from soil samples using the spread plate technique and selective skim milk agar media. The formation of clear zones and the determination of the proteolytic index were the starting point for a qualitative analysis of protease activity. Protease activity was determined quantitatively. The substrate is 1% casein dissolved in a 0.2 M tris-HCl buffer at pH 7.5, while the standard is tyrosine. The quantitative measurement of protease activity was carried out concurrently with the bacterial growth curve determination. The proteolytic bacteria P02 was successfully isolated in this research, having a protease enzyme activity of 0.867 U/mL and a proteolytic index of 0.8 ± 0.1 . Protease activity peaked when the bacterial

growth was in the logarithmic phase. Proteolytic bacterial P02 was Gram-positive and possesses the ability to form endospores and has a rod-shaped cell morphology. According to the outcomes of biochemical physiological testing, the bacterial P02 is considered to be the genus of *Bacillus* sp. The proteolytic bacteria P02 has potential to provide a sustainable and renewable source of protease, which is widely employed in industry and biotechnology.

Keywords: Soil Bacteria, Enzyme, Potential Microbes, Protease, Proteolytic

1. PENDAHULUAN

Protease merupakan enzim yang berfungsi memecah ikatan peptida dalam protein menjadi peptida atau asam amino (monomer yang lebih kecil). Enzim protease banyak digunakan dalam industri makanan, farmasi, kesehatan, detergen, kulit dan tekstil, kosmetik, pengolahan limbah di lingkungan hingga penelitian bioteknologi dan biologi molekuler (Kumar, 2020; Song et al., 2023). Dalam bidang industri makanan, protease berguna untuk melunakkan daging, meningkatkan kualitas kedelai dalam fermentasi pembuatan kecap (Devanthi & Gkatzionis, 2019). Aplikasi protease dalam bidang kesehatan misalnya sebagai agen fibrinolitik untuk mencegah terbentuknya pembekuan darah (trombus) (Afriansyah & Ethica, 2023; Permatasari et al., 2024). Dalam bidang industri detergen, protease berguna untuk meningkatkan kemampuan pembersihan, khususnya terhadap noda protein seperti darah (Singh et al., 2022; Te Chuan et al., 2022). Selain itu, protease banyak dimanfaatkan dalam bidang pengolahan limbah seperti bioremediasi (Gautam et al., 2022). Bidang industri kulit dan tekstil juga memanfaatkan protease dalam proses pembersihan bulu pada kulit (Gao et al., 2023).

Luasnya aplikasi protease dalam berbagai bidang tidak terlepas dari keunggulan enzim protease yang umumnya diketahui memiliki karakteristik mampu bekerja optimum dalam berbagai kondisi suhu dan pH (Obichi & Ezebuoro, 2021). Selain itu, protease juga diketahui memiliki banyak jenis dan dikelompokkan berdasarkan situs lokasi kerjanya (eksopeptidase dan endopeptidase), sumber enzim (berasal dari tanaman, hewan, dan mikroba), serta mekanisme katalisisnya (aspartat, glutamat, metaloprotease, sistein, serin, dan treonin) (Mamo & Assefa, 2018; Lindberg et al., 2021; Lai et al., 2023).

Sebagian besar protease banyak diproduksi oleh mikroba, baik cendawan maupun bakteri. Dibandingkan dengan sumber lain seperti tanaman dan hewan, protease dari mikroba memiliki lebih banyak keunggulan karena dapat diproduksi dalam skala industri,

waktu budidaya yang lebih singkat, serta mudah dipanen (Ratnaningrum et al., 2023). Beberapa contoh cendawan yang diketahui mampu menghasilkan protease diantaranya *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Neurospora* sp., *Taxomyces* sp., *Thermoascus* sp., *Thermomyces* sp., *Xylaria* sp., *Humicola* sp., *Fusarium* sp., *Endothia* sp., dan *Mucor* sp. (Bezerra et al., 2021; Gupta et al., 2023; Meshram et al., 2017; Pawar et al., 2023). Jenis genus bakteri yang juga memproduksi protease serta telah banyak diaplikasikan dalam bidang industri seperti *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptomyces*, *Lactobacillus* sp., *Macroccoccus* sp., *Clostridium* sp., *Serratia marcescens* sp., *Enterobacter* sp., *Paenibacillus* sp., *Microbacterium* sp. dan *Lysinibacillus* (Chumphon et al., 2022; Lemenh et al., 2021; Salam Khattab & Al-Nazzal, 2024; Song et al., 2023). *Bacillus* sp. Dilaporkan merupakan bakteri potensial penghasil protease yang telah banyak dikomersialkan (Razzaq et al., 2019).

Berdasarkan penjelasan fakta tersebut, peneliti tertarik melakukan eksplorasi isolat bakteri potensial penghasil protease dengan tujuan menemukan jenis atau strain bakteri baru dengan potensi aktivitas enzim protease yang lebih tinggi dan stabil dalam kondisi pH dan suhu dengan rentang yang luas (*broad spectrum*) serta sesuai dengan bidang aplikasinya. Pada penelitian ini, bakteri proteolitik diisolasi dari tanah karena tanah diketahui merupakan habitat berbagai populasi mikroba.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan dalam penelitian ini antara lain: pH meter, mikroskop, pipet mikro, spektrofotometer, inkubator, sentrifugator, vorteks, penggoyang (*shaker*), dan autoklaf. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi sampel tanah, larutan NaCl fisiologis 0.85%, media Skim Milk (susu skim 10 g, tripton 5 g, ekstrak khamir 2.5 g, glukosa 1 g, akuades 1000 mL), media Luria Bertani (NaCl 5 g, tripton 10 g, ekstrak khamir 6 g, akuades 1000 mL), larutan ungu kristal, larutan safranin, larutan iodin, alkohol 95%, larutan hijau malakit, larutan

stok tirosin 5 mg/mL, larutan stok Bovine Serum Albumine (BSA) 1 mg/mL, bufer tris-HCl 0.2 M pH 7.5, reagen Bradford (Coomasie brilliant blue G250 50 mg, etanol 95% 25 mL, Orthophosphor acid 85% 50 ml, akuades 500 mL), larutan Trichloro acetic acid (TCA) 10%, akuades steril, larutan Na₂CO₃ 0.5 M, larutan Folin Ciaocalteau, larutan H₂O₂ 3%, media uji fermentasi gula (tripton 2 g, glukosa/ laktosa/ maltosa/ sukrosa 1 g, indikator fenol merah 0.15 g, akuades 100 mL), media agar darah, dan kertas uji oksidase.

2.2. Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari lingkungan peternakan *Experiment Farm* Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman. Bagian tanah yang diambil merupakan lapisan tanah atas (*top soil*) dengan kedalaman kurang lebih 15 cm. Sampel tanah memiliki tekstur gembur, tidak terlalu padat, serta berwarna coklat gelap kehitaman. Sampel tanah diambil dari 2 titik lokasi berbeda, masing-masing berjarak sekitar 3 meter dari bagian depan dan samping kandang ternak. Sampel tanah diambil dengan menggunakan sekop kurang lebih sebanyak 500 gram. Sampel tanah dimasukkan ke dalam plastik steril, disimpan dalam *cooler box* untuk dibawa ke laboratorium.

2.3. Isolasi Bakteri Proteolitik

Sampel tanah ditimbang 10 gram, lalu dimasukkan ke dalam 90 mL media *Skim Milk* 1% (w/v). Selanjutnya di inkubasi pada *shaker* di suhu ruang selama 18 jam. Isolasi bakteri proteolitik dilakukan dengan metode cawan sebar (*spread plate*). Pengenceran sampel dilakukan dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.85% secara bertingkat dari 10⁻¹ hingga 10⁻⁵. Selanjutnya, sebanyak 0.1 mL suspensi sampel dari pengenceran 10⁻³ hingga 10⁻⁵ masing-masing disebar pada media *Skim Milk Agar* (SMA) dan diinkubasi di suhu ruang selama 24 – 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dan menghasilkan zona bening diamati untuk selanjutnya dilakukan pencirian morfologi koloni dengan menentukan bentuk, warna, ukuran, elevasi, tepian, dan permukaan koloni bakteri.

2.4. Uji Kualitatif Aktivitas Protease

Isolat bakteri diinokulasikan pada media SMA, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah itu, zona bening yang terbentuk disekitar koloni diamati dan dihitung indeks proteolitiknya menggunakan rumus berikut (Putri et al., 2024).

$$\text{Indeks Proteolitik (IP)} = \frac{\text{DZ} - \text{DK}}{\text{DK}}$$

Keterangan :

DZ : diameter zona bening (mm)

DK : diameter koloni bakteri (mm)

2.5. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri dan Uji Kuantitatif Aktivitas Protease

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media cair susu skim 1% (w/v), kemudian diinkubasi dengan diletakkan diatas inkubator bergoyang (*shaker*) pada suhu ruang. Setiap setengah jam, densitas sel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 600 nm. Setelah densitas sel mencapai 0.6-0.8 Absorbansi, 1 mL kultur dipindahkan ke dalam media fermentasi yaitu, 100 mL media cair susu skim 1%. Untuk menjaga aerasi kultur, inkubasi dilakukan dengan meletakkan media fermentasi yang telah diinokulasi bakteri di atas inkubator bergoyang (*shaker*) pada suhu ruang. Densitas kultur sel bakteri diukur setiap jam dengan spektrofotometer (λ 600 nm).

Pengukuran aktivitas protease dilakukan bersamaan dengan pembuatan kurva tumbuh bakteri. Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan cara memanen kultur dalam media fermentasi setiap 2 jam. Kemudian, kultur disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Supernatan hasil sentrifuse merupakan Enzim Ekstrak Kasar (EEK) yang akan digunakan dalam pengujian aktivitas protease secara kuantitatif. Substrat yang digunakan untuk mengukur aktivitas protease adalah kasein 1% yang dilarutkan dalam bufer tris-HCl 0.2 M pada pH 7.5. Standar yang digunakan dalam pengukuran aktivitas enzim adalah asam amino tirosin.

Pengujian aktivitas protease dimulai dengan memuat kurva standar tirosin dengan konsentrasi 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, dan 1 mg/mL. Masing-masing konsentrasi tirosin diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (λ 578 nm). Selanjutnya, data kurva standar diolah dengan Ms.Excel hingga diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0149x + 0,0089$ dengan $R^2 = 0,98$. Kemudian, disiapkan 3 tabung reaksi yang terdiri atas blanko, kontrol dan sampel. Setiap tabung diisi dengan 0.5 mL substrat kasein 1% yang dilarutkan dalam bufer tris-HCl 0.2 M pH 7.5. Tabung reaksi untuk sampel ditambahkan 0.1 mL EEK, divorteks, diinkubasi selama 15 menit di suhu ruang. Selanjutnya, setiap tabung reaksi ditambahkan 1 mL larutan *Trichloro Acetic Acid* (TCA) 10%. Kemudian, tabung reaksi kontrol ditambahkan 0.1 mL EEK sedangkan tabung reaksi untuk blanko ditambahkan 0.1 mL

akuades steril. Setelah itu, cairan pada masing-masing tabung disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 9000 rpm selama 10 menit. Kemudian cairan supernatan dipisahkan dari pelet, dilanjutkan dengan penambahan 2.5 mL larutan Na_2CO_3 0.5 M dan 0.5 mL reagen Folin Ciocalteau (tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil agar terbentuk kondisi gelap), lalu dikocok dan diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer (λ) 578 nm. Perhitungan aktivitas protease dilakukan berdasarkan rumus berikut (Shad et al., 2024).

$$\text{Aktv. Protease (U/ml)} = \frac{((X_s - X_k) \times FP \times 1000)}{(\text{BM tirosin} \times t (\text{menit}))}$$

Keterangan

- Xs : konsentrasi tirosin sampel
- Xk : konsentrasi tirosin kontrol
- FP : faktor pengenceran
- T : waktu inkubasi
- Bobot Molekul Tirosin : 181.19 gram/mol

2.6. Karakterisasi Isolat Bakteri Proteolitik

Pencirian isolat bakteri potensial penghasil protease dilakukan dengan mengamati morfologi dan penataan sel bakteri, pewarnaan Gram, pewarnaan spora, serta uji fisiologis biokimia yang meliputi uji katalase, uji oksidase, uji fermentasi gula (glukosa, sukrosa, dan laktosa), produksi indol, Methyl Red (MR), Voges Proskauer (VP), motilitas, dan uji hemolisis.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri proteolitik dari sampel tanah diperoleh 3 isolat bakteri. Ketiga isolat diberi kode P01, P02, dan P03. Ketiga isolat tersebut memiliki karakteristik morfologi koloni yang berbeda. Perbedaan karakteristik atau ciri morfologi kedua isolat bakteri proteolitik dapat dilihat pada **Tabel 1**. Perbedaan ciri morfologi koloni bakteri dapat menjadi langkah awal dalam menentukan genus atau spesies bakteri. Ciri morfologi koloni yang berbeda menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri tersebut berbeda jenisnya (Sousa et al., 2013; Suchwalko et al., 2013).

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni isolat bakteri proteolitik

Morfologi Koloni Bakteri	Kode Isolat Bakteri		
	P01	P02	P03
Bentuk	Tidak beraturan	Bulat	Bulat
Elevasi Tepian	Datar	Cembung	Datar
Warna Permukaan	Keriting	Rata	Rata
	Kuning	Krem	Putih
	Berkerut	Halus	Halus

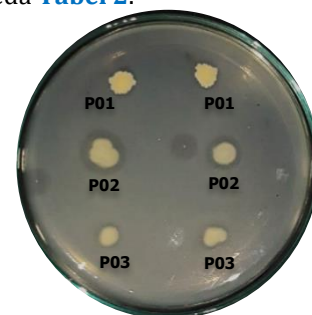
Morfologi Koloni Bakteri	Kode Isolat Bakteri		
	P01	P02	P03
Sifat Optik	<i>Opaque</i>	<i>Opaque</i>	<i>Translucent</i>
Ukuran	4 mm	6 mm	3 mm

Keterangan:

- P01 : Isolat bakteri proteolitik 1,
- P02 : Isolat bakteri proteolitik 2,
- P03 : Isolat bakteri proteolitik 3.

Uji kualitatif aktivitas protease dari isolat bakteri bertujuan mengetahui kemampuan bakteri dalam mensekresikan enzim yang dapat menghidrolisis protein (proteolitik). Kemampuan bakteri mendegradasi protein yang terkandung dalam media ditunjukkan oleh zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri, yang mengindikasikan bahwa substrat protein yang terkandung dalam susu skim telah dipecah atau dihidrolisis menjadi molekul yang lebih sederhana (asam amino) oleh enzim protease yang diproduksi oleh bakteri (Fachrial et al., 2021). Besar kecilnya kemampuan protease yang disekresikan oleh bakteri dalam mendegradasi protein dapat diukur dengan menghitung nilai indeks proteolitik (Ramadhan et al., 2021).

Ketiga isolat bakteri yaitu P01, P02, dan P03 memiliki kemampuan menghasilkan protease. Hal ini dibuktikan dengan pembentukan zona bening disekitar koloni bakteri **Gambar 1**. Isolat bakteri P02 memiliki nilai indeks proteolitik sebesar 0.8 ± 0.1 sedangkan P01 dan P03 memiliki nilai indeks proteolitik yang lebih kecil berturut-turut yaitu 0.3 ± 0.1 dan 0.4 ± 0.1 . Perbedaan nilai indeks proteolitik ini dapat disebabkan oleh perbedaan kemampuan bakteri dalam memproduksi enzim protease sehingga kemampuannya mendegradasi protein yang terdapat pada media juga berbeda **Tabel 2**.



Gambar 1. Uji kualitatif protease isolat bakteri proteolitik berdasarkan pembentukan zona bening

Tingkat kekeruhan zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri juga dapat menunjukkan kemampuan suatu enzim dalam

menghidrolisis substratnya. Zona yang jernih menunjukkan suatu enzim yang dihasilkan oleh bakteri dapat mendegradasi substratnya sampai ke tingkat monomer, sebaliknya zona yang sedikit keruh menunjukkan bahwa enzim tidak mampu mendegradasi substratnya hingga ke tingkat monomer.

Tabel 2. Indeks proteolitik (IP) isolat bakteri

No.	Kode Isolat	Indeks Proteolitik
1	P01	0.3 ± 0.1
2	P02	0.8 ± 0.1
3	P03	0.4 ± 0.1

Keterangan:

P01 : Isolat bakteri proteolitik 1,

P02 : Isolat bakteri proteolitik 2,

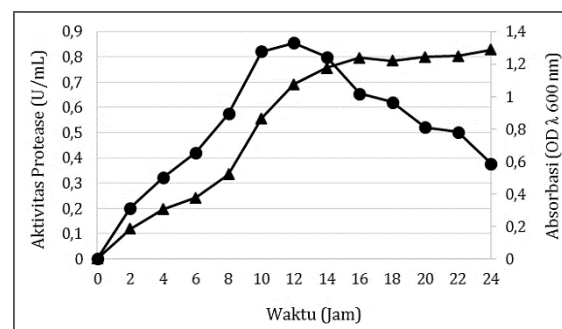
P03 : Isolat bakteri proteolitik 3.

Indeks proteolitik ketiga isolat bakteri pada penelitian ini (P01, P02, P03) lebih kecil dibandingkan hasil penelitian sebelumnya (Fitriana & Asri, 2021; Setyawati et al., 2022). Namun, lebih besar dari penelitian yang dilakukan oleh (Pratika et al., 2021). Tinggi rendahnya indeks proteolitik bergantung pada kemampuan bakteri dalam memproduksi protease yang berfungsi memecah substrat pada media. Kemampuan bakteri dalam mensekresikan protease dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kandungan bahan organik, kelembapan, pH, dan suhu lingkungan (Fanin et al., 2022; López-Trujillo et al., 2023; Nirmala et al., 2021). Selain itu, dalam proses kulturasi di laboratorium, aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri sangat bergantung pada pH media, suhu, dan lama waktu inkubasi, ukuran inokulum, sumber karbon dan nitrogen pada media, konsentrasi substrat, serta spesies bakteri (Banerji et al., 2020; Mohd Alias et al., 2023).

Uji kuantitatif aktivitas protease bertujuan mengetahui besarnya unit enzim yang bekerja dalam memecah substrat menjadi produk. Definisi Unit (U) aktivitas enzim yaitu jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah atau menghidrolisis substrat menjadi 1 μmol produk persatuan waktu tertentu (Onyeogaziri & Papaneophytou, 2019).

Pada penelitian ini, uji kuantitatif aktivitas protease hanya dilakukan pada isolat bakteri yang memiliki indeks proteolitik terbesar, yaitu isolat bakteri P02. Hasil uji kuantitatif aktivitas protease paling tinggi yaitu 0.867 U/mL yang dicapai pada jam ke-12 inkubasi. Aktivitas protease tertinggi dicapai pada saat bakteri berada di fase logaritmik

(eksponensial) atau awal fase stasioner **Gambar 2**. Hal ini sama seperti hasil penelitian sebelumnya yang juga menyatakan bahwa sekresi protease meningkat pada saat bakteri berada pada fase logaritmik dalam pertumbuhannya. Hal tersebut karena enzim protease merupakan metabolit primer yang disekresikan bakteri untuk memecah substrat yang terdapat pada media (Yang et al., 2021).

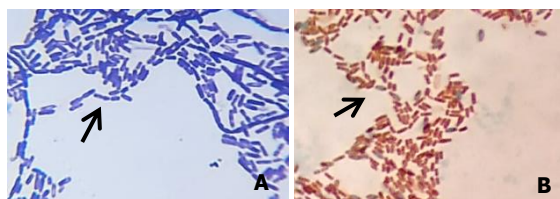


Gambar 2. Grafik kurva pertumbuhan (▲) dan aktivitas enzim protease (●) isolat bakteri P02 dalam media cair susu skim 1% (w/v)

Aktivitas protease isolat P02 lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian (Prihatiningsih et al., 2021) yang menyatakan bahwa bakteri proteolitik asal tanah memiliki aktivitas enzim hingga 1.318 U/mL. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa aktivitas protease suatu isolat bakteri mencapai 25 - 35 U/mL bergantung kondisi fermentasi (Ilmiah et al., 2018). Sebaliknya, penelitian (Pratika et al., 2021; Sumardi et al., 2018) menyatakan bahwa aktivitas protease bakteri *Bacillus* sp. lebih rendah jika dibandingkan isolat bakteri P02 pada penelitian ini. Tinggi rendahnya aktivitas protease yang dihasilkan oleh bakteri sangat bergantung pada beberapa faktor, antara lain spesies atau jenis bakteri proteolitik, komposisi media kulturasi, stabilitas pH dan suhu, konsentrasi substrat pada media, waktu inkubasi, agitasi, dan keberadaan ion logam (Inayah et al., 2016; Suleiman et al., 2020). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa ion logam seperti Mg^{2+} , dan ion Ca^{2+} , Mn^{2+} , K^{+} dan Na dapat berperan sebagai aktivator maupun inhibitor yang mempengaruhi aktivitas protease (Ilmiah et al., 2018).

Sesuai dengan hasil pewarnaan Gram, isolat bakteri P02 adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang (basil) dengan penataan berantai. Selain itu, isolat bakteri tersebut memiliki kemampuan membentuk endospora (Gambar 3). Hasil pewarnaan endospora dari isolat P02 menunjukkan sel vegetatif bakteri

tampak berwarna merah muda dan endospora berwarna hijau.



Gambar 3. Morfologi sel bakteri isolat P02, A) Berbentuk batang Gram positif; B) Sel vegetatif dan endospora pada perbesaran mikroskop 1000×

Hasil pengujian fisiologis (biokimia) isolat bakteri proteolitik P02 terangkum pada **Tabel 3.**

Tabel 3. Karakteristik fisiologis isolat bakteri proteolitik P02

No	Jenis Uji	Hasil Uji
1.	Katalase	+
2.	Oksidase	-
3.	Fermentasi Glukosa	+
4.	Fermentasi Laktosa	-
5.	Fermentasi Maltosa	+
6.	Produksi Indol	-
7.	Methyl Red (MR)	-
8.	Voges Proskauer (VP)	-
9.	Motilitas	-
10.	Hemolisis	-

Berdasarkan hasil uji fisiologis yang telah dilakukan dan memperhatikan morfologi sel bakteri, isolat bakteri P02 diduga merupakan bakteri dari genus *Bacillus* sp. Bakteri *Bacillus* sp. memiliki ciri fisiologis antara lain mampu memfermentasi gula seperti glukosa, maltosa, fruktosa, dekstrosa, menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, memproduksi katalase, positif pada motilitas dan negatif pada uji Voges Proskauer (VP) (Rajashakhar et al., 2017). Selain itu, beberapa spesies *Bacillus* sp. dilaporkan tidak memiliki kemampuan melisis sel darah (hemolisis negatif) (Ebnetorab et al., 2020). Sebaliknya, (Ainutajriani et al., 2023; Gai et al., 2023; Setyawati et al., 2022; Sumardi et al., 2018) melaporkan bahwa *B. cereus* dan *B. subtilis* memiliki kemampuan hemolisis.

Kemampuan isolat bakteri P02 dalam menghasilkan protease dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang, seperti industri makanan (untuk membuat keju, melunakkan daging, dan fermentasi), detergen (untuk menghilangkan noda protein), farmasi (dalam pembuatan obat), serta industri kulit (untuk proses penyamakan).

Dengan demikian, bakteri proteolitik P02 dapat menjadi sumber enzim penting dan bernilai tinggi yang ramah lingkungan dan berkelanjutan (Adetunji et al., 2023; Pessela et al., 2023; Song et al., 2023).

4. SIMPULAN

Isolat bakteri tanah P02 merupakan bakteri potensial yang mampu menghasilkan protease dengan indeks proteolitik 0.8 ± 0.1 . Aktivitas protease tertinggi (0.867 U/mL) dicapai pada saat pertumbuhan bakteri berada dalam fase logaritmik. Isolat bakteri P02 diduga merupakan genus *Bacillus* sp. Karakterisasi protease, seperti optimasi suhu, pH, konsentrasi substrat, penambahan kation, serta penentuan bobot molekul enzim perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum dan stabilitas aktivitas enzim tersebut.

REFERENSI

- Adetunji, A. I., Olaitan, M. O., Erasmus, M., & Olaniran, A. O. (2023). Microbial Proteases: A Next Generation Green Catalyst for Industrial, Environmental and Biomedical Sustainability. *Food Materials Research*, 3. <https://doi.org/10.48130/FMR-2023-0012>
- Afriansyah, M. A., & Ethica, S. N. (2023). Fibrinolytic Protease-Producing Bacteria with Varied Hemolysis Pattern Associated with Marine Algae Dictyota sp. *Medical Laboratory Technology Journal*, 9(2), 101–112. <https://doi.org/10.31964/mltj.v9i2.525>
- Ainutajriani, A., Darmawati, S. R. I., & Zilda, D. S. (2023). Production Optimization, Partial Purification, and Thrombolytic Activity Evaluation of Protease of *Bacillus cereus* HSFI-10. *Biotropia*, 30(2), 147–157. <https://doi.org/10.11598/btb.2023.30.2.1765>
- Banerji, S., Simon, S., Tille, A., Fruth, A., & Flieger, A. (2020). Genome-based *Salmonella* Serotyping as The New Gold Standard. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61254-1>
- Bezerra, V. H. S., Cardoso, S. L., Fonseca-Bazzo, Y., Silveira, D., Magalhães, P. O., & Souza, P. M. (2021). Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. *Molecules*, 26(22), 1–20.

- <https://doi.org/10.3390/molecules26227062>
- Chumphon, T., Promnuan, Y., Meelai, S., & Promsai, S. (2022). Effective Enzyme-Producing Bacteria Isolated from Diversified Thai Rice and Native Thai Bees (Cavity Nesting Honey Bees) and Their Potential for Production of Protease Enzymes. *Pharmacognosy Journal*, 14(3), 506–517.
<https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.64>
- Devanathi, P. V. P., & Gkatzionis, K. (2019). Soy Sauce Fermentation: Microorganisms, Aroma Formation, and Process Modification. *Food Research International*, 120(1), 364–374.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.010>
- Ebneterab, S. M. A., Ahari, H., & Kakoolaki, S. (2020). Isolation, Biochemical and Molecular Detection of *Bacillus Subtilis* and *Bacillus Licheniformis* from The Digestive System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and Its Inhibitory Effect on *Aeromonas Hydrophila*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(6), 2824–2845.
<https://doi.org/10.22092/ijfs.2020.122770>
- Fachrial, E., Krisdianilo, V., Harmileni, Lister, I. N. E., Nugroho, T. T., & Saryono. (2021). Isolation, Characterization, Activity Test and Molecular Identification of Thermophilic Bacteria Producing Proteases from Dolok Tinggi Raja Natural Hot Springs, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(4), 1725–1732.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d220416>
- Fanin, N., Mooshammer, M., Sauvadet, M., Meng, C., Alvarez, G., Bernard, L., Bertrand, I., Blagodatskaya, E., Bon, L., Fontaine, S., Niu, S., Lashermes, G., Maxwell, T. L., Weintraub, M. N., Wingate, L., Moorhead, D., & Nottingham, A. T. (2022). Soil Enzymes In Response to Climate Warming: Mechanisms and Feedbacks. *Functional Ecology*, 36(6), 1378–1395.
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.14027>
- Fitriana, N., & Asri, M. T. (2021). Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Trenggalek. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 11(1), 144–152.
<https://doi.org/10.26740/lenterabio.v11n1.p144-152>
- Gai, C., Zheng, X., Xu, L., Diao, J., Ye, H., Cao, H., & Yu, X. (2023). Haemolytic *Bacillus subtilis*, A Potential Pathogen of Hemorrhage Disease in Farmed Yellow Catfish *Pelteobagrus Fulvidraco*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, 75(2), 1–9.
<https://doi.org/10.46989/001c.84493>
- Gao, M., Song, J., Zhang, X., Zhang, C., Peng, B., & Chattha, S. A. (2023). Key Mechanism of Enzymatic Dehairing Technology for Leather-Making: Permeation Behaviors of Protease Into Animal Hide and The Mechanism of Charge Regulation. *Collagen and Leather*, 5(1).
<https://doi.org/10.1186/s42825-023-00117-7>
- Gautam, S., Tahir, A., & Mishra, D. (2022). Environmental Bioremediation : Utilizing Acidic Protease Enzymes for Waste Management *International Journal Of Food and Nutritional Sciences*. 11(2002), 4952–4969.
- Gupta, A., Meshram, V., Gupta, M., Goyal, S., Qureshi, K. A., Jaremko, M., & Shukla, K. K. (2023). Fungal Endophytes: Microfactories of Novel Bioactive Compounds with Therapeutic Interventions; A Comprehensive Review on the Biotechnological Developments in the Field of Fungal Endophytic Biology over the Last Decade. *Biomolecules*, 13(7), 1–44.
<https://doi.org/10.3390/biom13071038>
- Ilmiah, S. N., Mubarik, N. R., & Wahyuntari, B. (2018). Characterization of Protease from *Bacillus licheniformis* F11.1 as a Bio-Detergent Agent. *Makara Journal of Science*, 22(3), 105–112.
<https://doi.org/10.7454/mss.v22i3.8809>
- Inayah, M. N., Ambarsari, L., & Meryandini, A. (2016). Karakterisasi Xilanase dari Bakteri Xilanolitik XJ20 asal Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Duabelas Jambi Indonesia. *Sumberdaya HAYATI*, 2(1), 25–30.
<https://doi.org/10.29244/jsdh.2.1.25-30>
- Kumar, M. (2020). Industrial Applications of Protease : A Review. *Journal of Natural Remedies*, 20(4), 1–6.

- Lai, R., Lin, M., Yan, Y., Jiang, S., Zhou, Z., & Wang, J. (2023). Comparative Genomic Analysis of a Thermophilic. *Genes*, *14*, 1-14. <https://doi.org/10.3390/genes14020466>
- Lemenh, Y. A., Biru, T. G., Chernet, A. Z., & Lema, F. B. (2021). Isolation and Identification of Protease-Producing Bacteria from Sludge and Sediment Soil around Adama, Ethiopia. *Indonesian Journal of Biotechnology*, *26*(4), 159-165. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.63987>
- Lindberg, D., Kristoffersen, K. A., Wubshet, S. G., Hunnes, L. M. G., Dalsnes, M., Dankel, K. R., Høst, V., & Afseth, N. K. (2021). Exploring Effects of Protease Choice and Protease Combinations in Enzymatic Protein Hydrolysis of Poultry By-Products. *Molecules*, *26*(17), 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules26175280>
- López-Trujillo, J., Mellado-Bosque, M., Ascacio-Valdés, J. A., Prado-Barragán, L. A., Hernández-Herrera, J. A., & Aguilera-Carbó, A. F. (2023). Temperature and pH Optimization for Protease Production Fermented by *Yarrowia lipolytica* from Agro-Industrial Waste. *Fermentation*, *9*(9), 1-15. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090819>
- Mamo, J., & Assefa, F. (2018). The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. *Journal of Food Quality*, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2018/7957269>
- Meshram, V., Saxena, S., Paul, K., Gupta, M., & Kapoor, N. (2017). Production, Purification and Characterisation of a Potential Fibrinolytic Protease from Endophytic *Xylaria curta* by Solid Substrate Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *181*(4), 1496-1512. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2298-y>
- Mohd Alias, N., Kee, C. G., Ne, C. F., Yazid, N. A., Samah, R. A., & Mortan, S. H. (2023). Effect of Temperature and Fermentation Time on Protease Production Using *Decapterus macarellus* Fish Waste. *Malaysian Applied Biology*, *52*(4), 27-34. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v52i4.j171>
- Nirmala, D., Yudha, P., & Cahyanto, D. (2021). The Effect of pH and Incubation Time on Rude Protease Enzymes Activity of *Bacillus mycoides* from Anchovy Isolates (*Stolephorus* Sp.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *679*(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/679/1/012075>
- Obichi, E. A., & Ezebuoro, V. (2021). Effects of Temperature and pH on the Stability of Protease Produced by *Alcaligenes faecalis* P2. *Journal of Applied Life Sciences International*, September, 1-9. <https://doi.org/10.9734/jalsi/2021/v24i1130266>
- Onyeogaziri, F. C., & Papanephytou, C. (2019). A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach. *SLAS Discovery*, *24*(5), 587-596. <https://doi.org/10.1177/2472555219830084>
- Pawar, K. S., Singh, P. N., & Singh, S. K. (2023). Fungal Alkaline Proteases and Their Potential Applications in Different Industries. *Frontiers in Microbiology*, *14*(3), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1138401>
- Permatasari, E. A., Indrayati, A., & Kurniasari, F. (2024). Isolasi dan Uji Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak Enzim Fibrinolitik Bakteri yang Berasal dari Limbah Cair Rumah Pemotongan Ayam (RPA) Di Karanganyar. *Prepotif: Jurnal Kesehatan Masyarakat*, *8*(1), 539-554.
- Pessela, B. C., Noma Okamoto, D., & Cabral, H. (2023). Editorial: Microbial Proteases: Biochemical Studies, Immobilization and Biotechnological Application. *Frontiers in Microbiology*, *14*(1), 1-2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1126989>
- Pratika, M., Ananda, M., & Suwastika, I. N. (2021). Protease Activity from Bacterial Isolates of *Nepenthes Maxima* Reinw. Ex Nees. *Journal of Physics: Conference Series*, *1763*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1763/1/012092>
- Prihatiningsih, N., Asnani, A., & Djatmiko, H. A. (2021). Extracellular protease from *Bacillus subtilis* B315 with Antagonistic Activity Against Bacterial Wilt Pathogen

- (*Ralstonia solanacearum*) of Chili. *Biodiversitas*, 22(3), 1291–1295. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220327>
- Putri, C. M., Rustama, M. M., & Putranto, W. S. (2024). Skrining Bakteri Asam Laktat dan Khamir Potensial Proteolitik Ekstraseluler dan Milk Clotting Activity dari Ekstrak dan Fresh Cheese Stroberi (*Fragaria X Ananassa Duch.*). *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 5(1), 61–82. <https://doi.org/10.24198/jthp.v5i1.49925>
- Rajashekhar, M., Shahanaz, & Kalia, V. K. (2017). Biochemical and Molecular Characterization of *Bacillus* Spp. Isolated from Insects. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(5), 581–588.
- Ramadhan, A. R., Bachruddin, Z., Widodo, Erwanto, Y., & Hanim, C. (2021). Isolation and Selection of Proteolytic Lactic Acid Bacteria from Colostrum of Dairy Cattle. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 788(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012077>
- Ratnaningrum, D., Kosasih, W., Endah, E. S., Lathifa, A. K. N., Diwan, A. M., Nida, V., Saraswati, V., & Risdian, C. (2023). Protease Production by Soil Bacteria for Green Technology: Screening and Optimization. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1201(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1201/1/012094>
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(6), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Salam Khattab, K. A., & Al-Nazzal, A. I. (2024). Production of the Protease Enzyme from *Bacillus cereus* Bacteria Isolated from Some Cooked Foods and Determining the Factors Affecting the Production of the Enzyme. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1371(6), 1–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1371/6/062042>
- Setyawati, E., Poernomo, T., & Sudjarwo, S. (2022). Screening And Identification of Fibrinolytic Bacteria From Tauco. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 9(2), 45–50. <https://doi.org/10.20473/bikfar.v9i2.42707>
- Shad, A. A., Ahmad, T., Iqbal, M. F., Asad, M. J., Nazir, S., Mahmood, R. T., & Wajeeha, A. W. (2024). Production, Partial Purification and Characterization of Protease through Response Surface Methodology by *Bacillus subtilis* K-5. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67(9), 1–16. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024210355>
- Singh, S., Patel, V. H., Pratap, S. G., Singh, P. K., & Tandon, P. K. (2022). Biochemical Characterization of Protease Enzyme Extracted from Different Plant Leaves and Seeds: Destaining Efficiency of Enzyme for Stain Removal. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 35(2), 175–181. <https://doi.org/10.5958/0974-4479.2022.00027.2>
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. (2023). Microbial Proteases and Their Applications. *Frontiers in Microbiology*, 14(9), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on Colony Morphology Identification Towards Bacterial Profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>
- Suchwalko, A., Buzalewicz, I., & Podbielska, H. (2013). Identification of Bacteria Species by Using Morphological and Textural Properties of Bacterial Colonies Diffraction Patterns. *Institute of Biomedical Engineering and Instrumentation, Wroclaw University of Technology*. <https://doi.org/10.1117/12.2020337>
- Suleiman, A. D., Yusof, H. M., & Yasid, N. A. (2020). Effect of Cultural Conditions on Protease Production by a Thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* SKF4 Isolated from Sungai Klah Hot Spring. *Molecules*, 25, 1–14. <https://doi:10.3390/molecules25112609>
- Sumardi, Agustrina, R., & Ekowati, C. N. (2018). Characterization of Protease from *Bacillus*

sp. on Medium Containing FeCl₃ Exposed to Magnetic Field 0.2 mt. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 130, 1–12. <https://doi:10.1088/1755-1315/130/1/012046>

Te Chuan, L., Ali Selimin, M., & Xin Tian, L. (2022). Efficiency Effect of Protease in Commercialized Detergent Powder on Blood Removal. *Research in Management of Technology and Business*, 3(1), 266–274. <https://doi.org/10.30880/rmtb.2022.03.01.019>

Yang, X., Wang, Z., Zhang, C., Wang, L., Pang, L., Zhang, D., & Man, C. (2021). Assessment of The Production of *Bacillus cereus* Protease and Its Effect on The Quality of Ultra-High Temperature-Sterilized Whole Milk. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6577–6587. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19818>