

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein

2.1.1 Definisi Protein

Protein berasal dari bahasa Yunani “proteios” yang berarti pertama atau utama. Protein merupakan makromolekul yang menyusun lebih dari separuh bagian dari sel. Protein menentukan ukuran dan struktur sel, komponen utama dari sistem komunikasi antar sel serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia didalam sel. Karena itulah sebagian besar aktivitas penelitian biokimia tertuju pada protein khususnya hormon, antibodi, dan enzim (Fatchiyah dkk, 2011).

Protein adalah zat makanan yang mengandung nitrogen yang diyakini sebagai faktor penting untuk fungsi tubuh, sehingga tidak mungkin ada kehidupan tanpa protein (Muchtadi, 2010). Protein merupakan makromolekul yang terdiri dari rantai asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida membentuk rantai peptida dengan berbagai panjang dari dua asam amino (dipeptida), 4-10 peptida (oligopeptida), dan lebih dari 10 asam amino (polipeptida) (Gandy dkk, 2014). Tiap jenis protein mempunyai perbedaan jumlah dan distribusi jenis asam amino penyusunnya. Berdasarkan susunan atomnya, protein mengandung 50-55% atom karbon (C), 20-23% atom oksigen (O), 12-19% atom nitrogen (N), 6-7% atom hidrogen (H), dan 0,2-0,3% atom sulfur (S) (Srianta, 2016).

2.1.2 Sumber Protein

Menurut Muchtadi (2010) sumber protein bagi manusia dapat digolongkan menjadi 2 macam, yaitu sumber protein konvensional dan non-konvensional

a. Protein konvensional

Protein konvensional merupakan protein yang berupa hasil pertanian dan peternakan pangan serta produk-produk hasil olahannya. Berdasarkan sifatnya, sumber protein konvensional ini dibagi lagi menjadi dua golongan yaitu protein nabati dan protein hewani.

1. Protein nabati, yaitu protein yang berasal dari bahan nabati (hasil tanaman), terutama berasal dari biji-bijian (sereal) dan kacang-kacangan. Sayuran dan buah-buahan tidak memberikan kontribusi protein dalam jumlah yang cukup berarti.
2. Protein hewani, yaitu protein yang berasal dari hasil-hasil hewani seperti daging (sapi, kerbau kambing, dan ayam), telur (ayam dan bebek), susu (terutama susu sapi), dan hasil-hasil perikanan (ikan, udang, kerang, dan lain-lain). Protein hewani disebut sebagai protein yang lengkap dan bermutu tinggi, karena mempunyai kandungan asam-asam amino esensial yang lengkap yang susunannya mendekati apa yang diperlukan oleh tubuh, serta daya cernanya tinggi sehingga jumlah yang dapat diserap (dapat digunakan oleh tubuh) juga tinggi.

b. Protein non-konvensional

Protein non-konvensional merupakan sumber protein baru, yang dikembangkan untuk menutupi kebutuhan penduduk dunia akan protein. Sumber protein non-konvensional berasal dari mikroba (bakteri, khamir, atau kapang), yang dikenal sebagai protein sel tunggal (single cell protein), tetapi sampai sekarang produknya belum berkembang sebagai bahan pangan untuk dikonsumsi.

2.2 Enzim Protease

2.2.1 Pengertian Enzim Protease

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease (protease serin, protease sistein/tiol, protease aspartat dan protease logam) adalah enzim yang banyak digunakan dalam industri, misalnya industri farmasi, kulit, detergen, makanan dan pengolahan limbah. Protease yang digunakan di dalam industri jumlahnya sekitar 60% dari penjualan enzim di dunia (Kurnia, 2010).

Protease dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti bakteri 44,78%, tanaman 43,85%, dan hewan 11,15%. Protease dari bakteri merupakan jumlah yang paling banyak dibandingkan dengan sumber lain, yaitu protease dari tumbuhan dan hewan. Protease bisa diisolasi dari bagian ekstrasel dan intrasel. Bakteri penghasil protease, khususnya protease ekstraseluler banyak diproduksi oleh spesies *Bacillus* (Baehaki dkk, 2011).

2.2.2 Klasifikasi Enzim Protease

Berdasarkan sistem klasifikasi IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), enzim-enzim proteolitik mikroba dikelompokkan menjadi endopeptidase dan eksopeptidase. Eksopeptidase (eksopeptidase) memecah protein dari ujung rantai polipeptida baik dari ujung amino atau karboksi substrat sehingga menghasilkan asam amino dan sisa peptida, sedangkan endoprotease (endopeptidase) memotong ikatan

polipeptida protein pada bagian dalam sehingga menghasilkan sejumlah peptida. Endopeptidase terdiri atas protease serin, protease sistein, protease aspartat dan protease metal. Penamaan tersebut menunjukkan bagian penting dari sisi katalik enzim. Sedangkan eksopeptidase terdiri atas amino peptidase, *carboxypeptidase* dan omega peptidase (Rao dkk, 1998).

2.2.3 Sumber-Sumber Enzim Protease

Sumber enzim protease yang telah diketahui berasal dari hewan, mikroba dan tanaman. Tanaman merupakan sumber protease terbesar yaitu 43,85% diikuti oleh bakteri sebesar 18,09%, jamur 15,08%, hewan 11,15%, alga 7,20% dan virus 4,41% (Mahajan dan Shamkat, 2010). Salah satu sumber penghasil enzim protease yang paling banyak diteliti adalah bakteri. Pemilihan bakteri sebagai sumber enzim protease disebabkan beberapa alasan yaitu:

1. Bakteri mudah cepat tumbuh dengan kecepatan yang lebih cepat dibandingkan makhluk hidup lainnya.
2. Skala produksi enzim mudah ditingkatkan.
3. Biaya produksi enzim relatif rendah.
4. Kondisi produksi tidak bergantung pada musim dan waktu proses produksi lebih pendek (Poernomo dan Purwanto, 2003).

2.3 Oncom

2.3.1 Pengertian Oncom

Oncom merupakan salah satu makanan fermentasi asal Indonesia. Fermentasi yaitu suatu proses metabolisme yang menghasilkan energi dengan cara menguraikan protein, karbohidrat dan lemak tanpa kehadiran oksigen bebas. Cara

fermentasi atau peragian ini telah digunakan oleh manusia sejak zaman dahulu untuk memproduksi makanan dan minuman. Oncom berasal dari daerah Jawa barat namun sangat populer dan digemari masyarakat diberbagai daerah (Sarwono, 2010).

Bahan baku yang umum digunakan dalam proses pembuatan oncom adalah bungkil kacang tanah atau ampas tahu. Bungkil kacang tanah adalah ampas yang berasal dari kacang tanah yang telah diambil minyaknya dengan proses pemerasan mekanis atau proses ekstraksi, sedangkan ampas tahu merupakan residu pengolahan kedelai menjadi tahu. Ampas tahu sebenarnya masih mempunyai nilai gizi yang cukup tinggi, tetapi kebanyakan sifat organoleptiknya kurang disukai. Ampas tahu dengan proses fermentasi (oncom merah) lebih disukai sebagai makanan dari pada tanpa fermentasi. Proses pembuatan oncom termasuk jenis fermentasi media padat, yaitu fermentasi yang menyertakan penggunaan substrat padat sebagai sumber karbon, nitrogen, dan energi (Afifah, 2014).

2.3.2 Jenis Oncom dan Cara Pembuatannya

Oncom terdiri dua jenis, yaitu merah dan hitam. Perbedaan kedua jenis oncom tersebut terletak pada jenis kapang. Oncom merah dihasilkan oleh kapang *Neurospora sitophila* yang mempunyai strain jingga, merah, merah muda, dan warna peach. Sedangkan oncom hitam dihasilkan oleh kapang *Rhizopus oligosporus*. Jadi, warna merah atau hitam pada oncom ditentukan oleh warna pigmen yang dihasilkan oleh kapang yang digunakan dalam proses fermentasi (Chayadi dan Surya, 2010).

Oncom terbuat dari kacang kedelai dan kacang tanah. Bahan baku lainnya yang diperlukan dalam pembuatan oncom adalah kapang. Kapang oncom dapat mengeluarkan enzim lipase dan protease yang aktif selama proses fermentasi dan memegang peranan penting dalam penguraian pati menjadi gula, penguraian bahan-bahan dinding sel kacang, dan penguraian lemak, serta pembentukan sedikit alkohol dan berbagai ester yang berbau sedap dan harum (James M. Jay, 2000).

Proses fermentasi oleh kapang *Neurospora sitophila* dan *Rhizopus oligosporus* telah terbukti mampu mencegah flatulensi (kembung perut). Selama proses fermentasi oncom, kapang akan menghasilkan enzim alpha-galaktosidase yang dapat menguraikan rafinosa dan stakhiosa kedelai sampai pada level yang sangat rendah, sehingga tidak berdampak pada terbentuknya gas.



Gambar 1. Oncom merah
(Sumber: Afifah, 2014)

2.4 Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus

Bacillus, Pseudomonas, Proteus, Steptobacillus dan *Staphylococcus* (Rizaldi dkk, 2016).

Tingkat aktivitas proteolitik dapat dilihat dari keaktifan enzim dalam menghidrolisis protein. Aktivitas bakteri proteolitik dapat diukur secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang ultra violet 280 nm. Panjang gelombang tersebut dapat ditangkap dan dipantulkan kembali oleh asam amino suatu protein berdasarkan gugus aromatik terutama asam amino tirosin, triptofan dan fenilalanin. Kelebihan metode ini yaitu sederhana, mudah serta tidak memerlukan penambahan reagen tertentu (Walker, 2002). Semua bakteri umumnya mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler. Struktur protein yang lebih kompleks menyebabkan dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks dibandingkan pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi. Mikroorganisme melalui suatu sistem enzim yang kompleks, memecah protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Senyawa-senyawa intermediet dan produk akhir hasil pemecahan asam amino. Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok (Rao dkk, 1998):

1. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora, misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*.
2. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora, misalnya *Bacillus*.
3. Bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya sebagian spesies *Clostridium*.

2.5 Identifikasi Bakteri

2.5.1 Identifikasi Mikrobiologi

Identifikasi tahap awal, dilakukan dengan cara uji morfologi dan fisiologi terhadap koloni bakteri. Uji morfologi dilakukan dengan pewarnaan gram dengan menggunakan mikroskop, sedangkan uji fisiologi dilakukan untuk menentukan ada tidaknya pergerakan (motilitas) bakteri menggunakan media semi padat. Selanjutnya dilakukan tes biokimia meliputi tes katalase, uji fermentasi karbohidrat, sitrat, uji H₂S, uji indol, dan uji lisin (Pratiwi, 2015).

2.5.2 Identifikasi Molekuler Menggunakan PCR 16S rRNA

Identifikasi bakteri yang lebih spesifik dapat dilakukan dengan identifikasi molekuler menggunakan molekul 16S rRNA karena molekul ini bersifat Subkunitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Analisis sekuensing 16S rRNA sudah banyak digunakan dibidang mikrobiologi. Metode berbasis molekuler ini dinilai lebih cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri serta memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan metode mikrobiologi konvensional. Gen 16S ribosomal RNA (16S rRNA) memiliki daerah yang *conserved* (lestari) sehingga tepat digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis sekuensing untuk menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies (Rinanda, 2011).

Gen 16S rRNA juga memiliki *hypervariable region* yang merupakan ciri khas dari mikroorganisme. Molekul 16S rRNA ini merupakan jenis RNA yang terlibat dalam produksi protein. Primer yang digunakan dalam identifikasi

bakteri menggunakan PCR 16S rRNA ini yaitu primer 27 F dan 1492 R. Kedua primer ini biasa digunakan untuk identifikasi gen 16S rRNA bakteri.

2.6 Polymerase Chain Reaction(PCR)

2.6.1 Prinsip Kerja PCR

PCR atau *Polymerase Chain Reaction* merupakan teknik amplifikasi DNA secara *invitro*. PCR merupakan cara yang sensitif, selektif dan sangat cepat untuk memperbanyak sekuen DNA yang diinginkan. Adapun prinsip dasar dari PCR yaitu :

1. Denaturasi

Denaturasi tahap awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR (Murray dkk, 2006).

2. Annealing (Penempelan Primer)

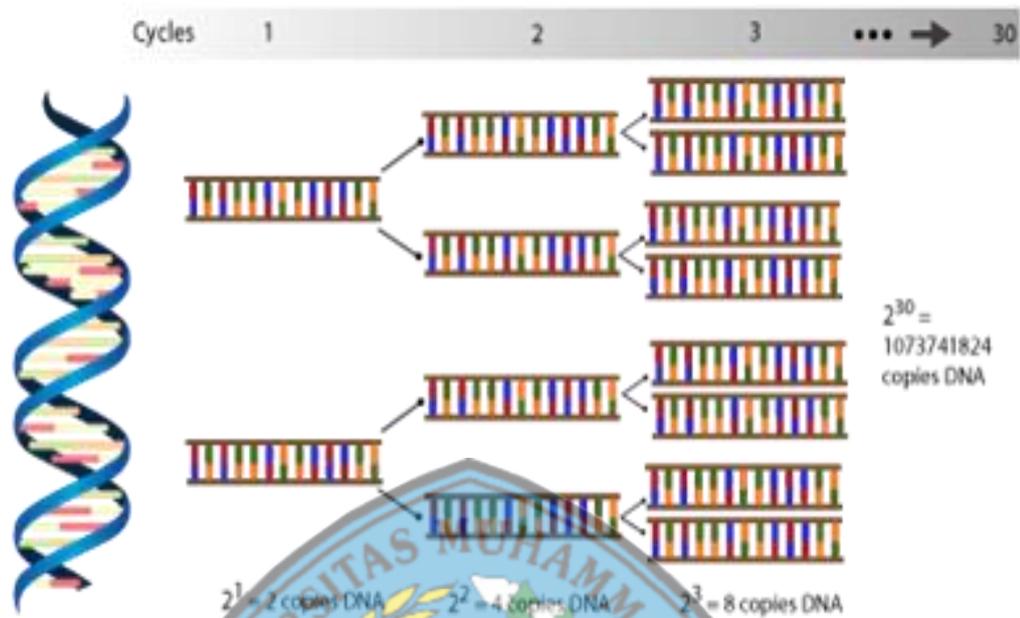
Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer

tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30-45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun temperatur yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C (Handoyo dan Rudiretna, 2000)

3. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada temperatur 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda. Reaksi-reaksi tersebut di atas diulangi lagi dari 25 – 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif (Yusuf, 2010).

Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction(PCR)



Gambar 2. *Polymerase Chain Reaction(PCR)*.
(Sumber : Handoyo dan Rudiretna, 2000)

2.6.2 Komponen-komponen PCR

Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandagakan, (2) oligonukleotida (primer), yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Primer yang digunakan dalam PCR ada dua, yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5' – fosfat dan oligonukleotida dengan sekuen pada ujung 3'–OH rantai DNA cetakan yang lain, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP dan (4) enzim DNA polimerase yaitu enzim yang berfungsi sebagai katalis dalam reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga berperan penting adalah buffer PCR (Yuwono, 2006).

2.7 Prinsip Kerja Gel Elektroforesis

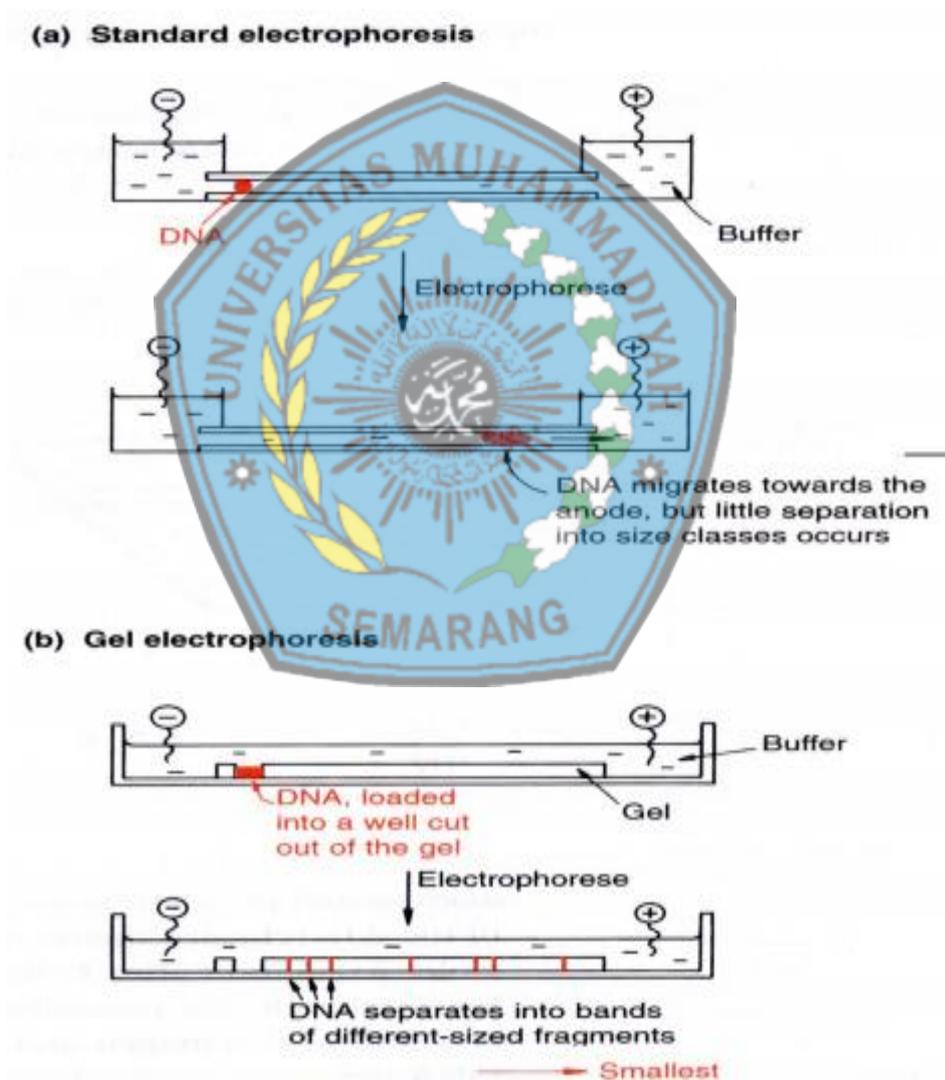
Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda). Elektroforesis digunakan untuk mengamati hasil amplifikasi dari DNA. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya *band* yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan potongan-potongan jumlah pasangan basanya (Klug dan Cummings 1994).

Teknik elektroforesis mempergunakan medium yang terbuat dari gel. Perpindahan partikel pada medium gel tersebut dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti ukuran partikel, komposisi dan konsentrasi gel, densitas muatan, kuat medan listrik dan sebagainya. Semakin kecil partikel tersebut, maka pergerakan atau migrasinya akan semakin cepat, karena matriks gel mengandung jaringan kompleks berupa pori-pori sehingga partikel-partikel tersebut dapat bergerak melalui matriks tersebut. Di dalam elektroforesis digunakan sumber arus listrik searah (DC), ruang untuk elektroforesis (*Comb, Well, platform* dan cetakan wadah gel), larutan *buffer* (*buffer* ionik dan *loading buffer*), matriks elektroforesis, *marker* dan gel (Brown 1992).

Elektroforesis digunakan dengan tujuan untuk mengetahui ukuran dan bentuk suatu partikel baik DNA, RNA dan protein. Selain itu, elektroforesis juga digunakan untuk fraksinasi yang dapat digunakan untuk mengisolasi masing-

masing komponen dari campurannya, mempelajari fitogenetika, kekerabatan dan mempelajari penyakit yang diturunkan. Elektroforesis dalam bidang genetika, digunakan untuk mengetahui ukuran dan jumlah basa yang dikandung suatu sekuen DNA tertentu (Klug & Cummings 1994).

Skema kerja elektroforesis gel agarosa



Gambar 3. Skema kerja gel elektroforesis.
(Sumber : Yusuf, 2010)

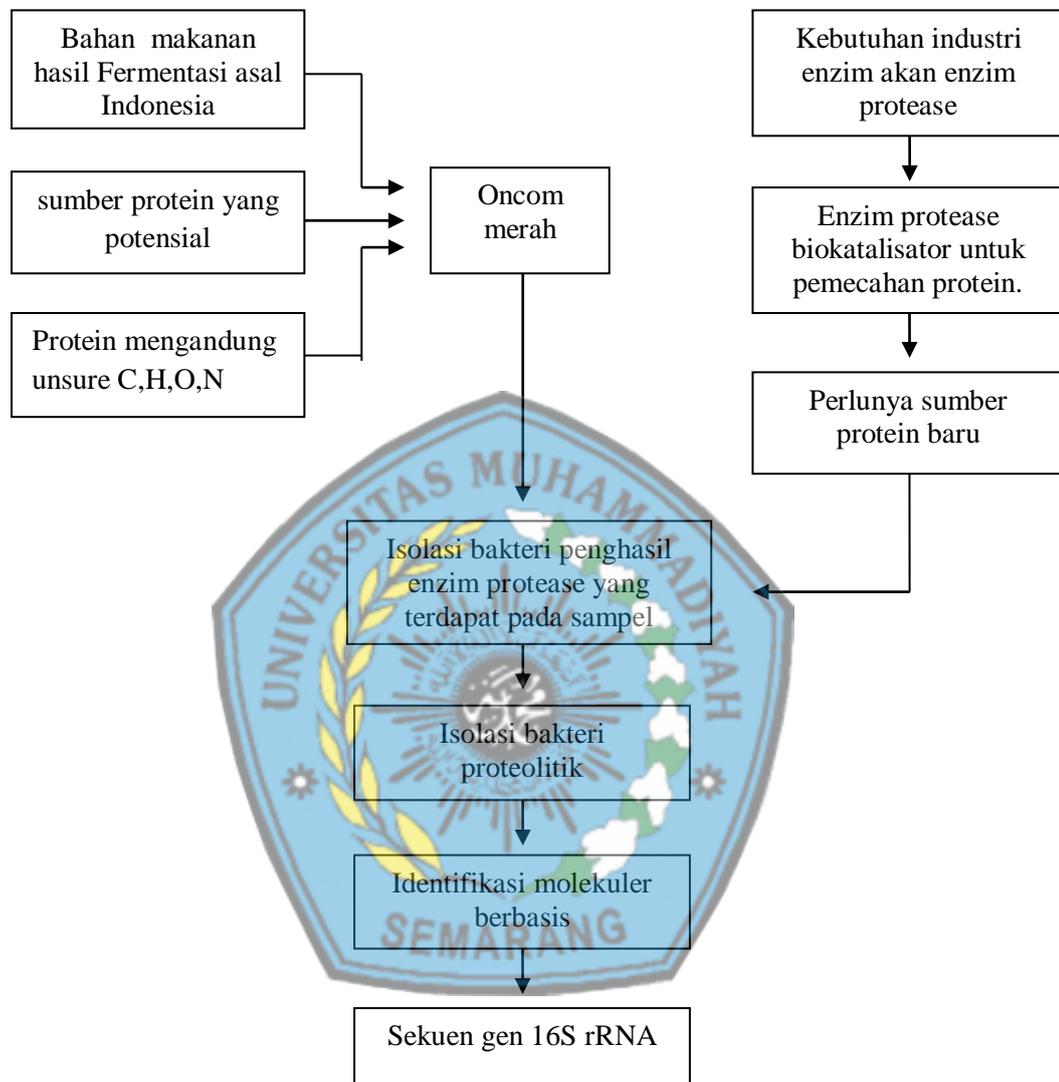
2.8 Prinsip Metode Sekuensing

Analisis sekuensing DNA telah banyak digunakan terutama dalam bidang penelitian. Kualitas analisis sekuensing sangat bergantung pada faktor kecepatan prosedur kerja dan teknologi yang digunakan. Langkah analisis sekuensing dimulai dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri. DNA yang diperoleh akan dijadikan sebagai cetakan dalam tahap amplifikasi PCR. Primer yang digunakan dalam PCR primer 16S rRNA yang bersifat universal berukuran 1500 bp, sehingga dapat mengamplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri (Maulid., 2015).

Produk PCR yang telah dimurnikan, ditentukan nukleotidnya melalui sekuensing. Pada tahap sekuensing ini produk PCR dengan ukuran tertentu digunakan sebagai cetakan. Primer pada tahap PCR juga digunakan dalam sekuensing, hanya masing-masing primer yang digunakan terpisah dalam satu siklus sekuensing (*forward* saja atau *reverse* saja). Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer reverse dan forward serta pada umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (*consensus sequence*). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di data base menggunakan software tertentu. (Clarridge, 2004; Rinanda, 2011)

1. Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
2. Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cmemsu.edu.html/>)
3. Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://ebi.ac.uk/embl/>)
4. Smart Gene IDNS (<http://.smartgene.ch>)
5. Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>).

2.9 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori