

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein

2.1.1 Definisi Protein

Protein merupakan zat gizi yang sangat penting, karena yang paling erat hubungannya dengan proses-proses kehidupan. Nama protein berasal dari bahasa Yunani (Greek) *proteus* yang berarti “yang pertama” atau “yang terpenting”. (Suhardjo dan Clara, 1992). Protein menentukan ukuran dan struktur sel, komponen utama dari sistem komunikasi antar sel serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia di dalam 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). Protein dapat dihidrolisis oleh asam, basa, atau enzim tertentu dan menghasilkan campuran asam-asam amino (Winarno, 2004).

Sumber protein di dalam makanan dapat dibedakan atas dua sumber yaitu protein hewani dan nabati. Oleh karena struktur fisik dan kimia protein hewani sama dengan yang dijumpai pada tubuh manusia, maka protein yang berasal dari hewan mengandung semua asam amino dalam jumlah yang cukup membentuk

dan memperbaiki jaringan tubuh manusia. Kecuali pada kedelai, semua pangan nabati mempunyai protein dengan mutu yang lebih rendah dibandingkan hewani (Agus Krisno Budianto, 2009). Beberapa makanan sumber protein ialah daging, telur, susu, ikan, beras, kacang, kedelai, gandum, jagung, dan buah – buahan. (Poedjiadi, 1994).

2.2 Enzim Protease

2.2.1 Definisi Enzim Protease

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel. Salah satu kelompok enzim yang banyak digunakan adalah enzim protease. (Arfarita, 2015; Naiola dkk., 2011).

Protease merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino, dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein (Poliana, 2007).

2.2.2 Klasifikasi Enzim Protease

Secara umum, menurut Bergman dan Futon protease dikelompokkan menjadi dua kelompok utama yaitu golongan eksopeptidase (eksoprotease) dan endopeptidase (endoprotease). Eksopeptidase dibagi menjadi karboksi (ekso) peptidase dan amino (ekso) peptidase yang berturut-turut memotong peptida dari arah gugus karbonil terminal dan gugus amino terminal, sedangkan endopeptidase memecah protein atau ikatan peptida dari dalam (internal) peptida menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Namun, berdasarkan sifat kimia dari residu asam amino yang berperan dalam aktivitas katalitik enzim, protease dikelompokkan Hartley (1960) menjadi empat kelompok yaitu protease serin, protease sulfhidril, protease aspartat, dan protease metal (Rao dkk., 1998):

1. Protease serin

- a) Memiliki residu serin dalam lokasi aktifnya.
- b) Bersifat endopeptidase
- c) Yang termasuk enzim ini: tripsin, kimotripsin, elastase dan subtilin

2. Protease sulfhidril

- a) Memiliki residu sulfhidril pada lokasi aktif
- b) Kerja enzim ini dapat dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat
- c) Yang termasuk enzim ini: protease dari tanaman dan mikroba seperti papain, fisin dan bromelin.

3. Protease metal

- a) Keaktifannya tergantung pada adanya metal dengan hubungan stoikiometrik 1 mol metal/1 molenzim
- b) Dapat dihambat oleh EDTA (*Ethlene Diamine Tetra Acetic Acid*) yang dapat mengkelat metal sehingga keaktifan enzim hilang/berkurang.
- c) Yang termasuk enzim ini: karboksipeptidase untuk beberapa amino peptidase

4. Protease asam

- a) Enzim yang pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil
- b) Aktif pada pH rendah, pH optimum pada 2,0-5,0
- c) Keaktifannya dapat dihambat oleh p-bromo fenasilbromida.
- d) Yang termasuk enzim ini: pepsin, renin dan protease kapang.

Berdasarkan sumbernya, enzim protease dikategorikan menjadi tiga yaitu hewani, nabati dan mikroba (bakteri, ragi dan kapang). Enzim protease nabati meliputi papain, fisin dan bromelin, sedangkan pepsin, rennin, kolagenase hewan, tripsin, kimotripsinogen dan elastase bersumber dari hewani, serta yang bersumber dari mikroba seperti kimopapain, elastase, keratinase, kolagenase bakteri, subtilisin, *scytalidopepsin* B ragi dan rennet mikroba (Juniarso, 2008)

2.3 Oncom

2.3.1 Definisi Oncom

Oncom Merah merupakan makanan produk fermentasi yang berasal dari Jawa Barat, Indonesia. Oncom Merah mempunyai sumber gizi dan kandungan protein yang tinggi karna adanya proses fermentasi, maka struktur kimia bahan-

bahan yang tadinya bersifat kompleks, akan terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna dan dimanfaatkan oleh tubuh. Meskipun oncom Merah merupakan produk limbah kedelai, namun oncom masih memiliki kandungan gizi dan protein yang tinggi yang bisa di manfaatkan oleh tubuh serta relatif murah dengan proses pembuatannya mudah (Sarwono, 2010).



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

Oncom merah dihasilkan oleh kapang *Neurospora sitophila* yang mempunyai strain jingga, merah, merah muda, dan warna peach, warna merah dari oncom merah ditentukan oleh warna pigmen yang dihasilkan oleh kapang yang digunakan dalam proses fermentasi. Kapang oncom merah dapat mengeluarkan enzim lipase dan protease yang aktif selama proses fermentasi. Oncom merah umumnya dibuat dari ampas tahu, yaitu kedelai yang telah diambil proteinnya dalam pembuatan tahu, agar mempunyai tekstur yang lebih baik dan lebih lunak. Walaupun bahan substrat tersebut berupa limbah, kandungan Kadar protein pada oncom 13 gram/100g oncom. (Nuraini dkk., 2015)

Kadar protein yang tinggi mengindikasikan proses pertumbuhan yeast berjalan dengan baik karena selama proses pertumbuhan, dihasilkan berbagai macam enzim oleh yeast. Kadar lemak yang cukup dibutuhkan karena senyawa ester (yang merupakan lemak) berguna untuk memberikan flavour yang sedap dan khas bagi produk. Kadar karbohidrat yang semakin rendah mengindikasikan pertumbuhan yeast yang semakin baik. Glukosa yang diperoleh dari pemecahan karbohidrat, dibutuhkan oleh yeast sebagai sumber makanan. Untuk memecah karbohidrat tersebut, yeast menghasilkan enzim – enzim yang merupakan protein globular, terutama enzim protease. Enzim protease ini berfungsi untuk menghidrolisis asam amino dalam ikatan peptida menjadi polipeptida yang merupakan rantai protein yang lebih pendek. Oleh karena itu kadar protein semakin meningkat (Siswono, 2002).

2.4 Bakteri Proteolitik

Bakteri merupakan organisme yang mempunyai penyebaran terluas di alam. Bakteri adalah prokariot, DNA-nya tidak terletak di dalam nukleus. Banyak bakteri mengandung lingkaran DNA ekstrakromosomal yang disebut plasmid. Di dalam sitoplasma tidak terdapat organel lain selain ribosom, yang berukuran lebih kecil dibandingkan sel-sel eukariotik. Bakteri selain mikoplasma, dikelilingi oleh suatu dinding sel kompleks, yang berbeda antara bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Banyak bakteri memiliki flagella, filia atau kapsul eksternal pada dinding sel (Setiaji, 2009). Bakteri mampu hidup pada berbagai habitat dan mampu menguraikan senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana untuk memperoleh zat-zat tertentu yang dibutuhkan dalam rangka

mempertahankan hidupnya. Selain itu bakteri dengan kemampuannya tersebut menjadi organisme terpenting yang berperan dalam proses penguraian dan dekomposisi. Bakteri mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi. Potensi tersebut berhubungan dengan kemampuan kemampuan yang dimilikinya seperti amilolitik, proteolitik, lipolitik, antibiosis, selulolitik, dan sebagainya (Hatmanti, 2000).

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu mendegradasi protein, karena memproduksi enzim protease ekstraseluler. Pada umumnya bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus*, dan *Staphylococcus* (Akmal, 1996). Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein (Puspitasari dkk., 2012).

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 sangat bervariasi.

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

Identifikasi Bakteri untuk memberikan informasi tambahan tentang isolat terpilih dilakukan identifikasi bakteri protease yang meliputi pengamatan morfologi koloni dan sel, pewarnaan Gram, kemampuan tumbuh pada media nutrisi agar dan media susu skim. Pada tahap awal bakteri ditumbuhkan dalam medium *Nutrient agar* (NA) untuk mengetahui jenis bakteri tersebut, dilakukan uji morfologi dengan pewarnaan gram untuk mengetahui jenis bakteri yang tumbuh (Fatimawali, 2013; Puspitasari, 2012).

Uji aktivitas protease dapat dilihat dengan media susu skim yang mengandung kasein. Kasein merupakan protein utama susu, suatu mikromolekul yang tersusun atas sub unit asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Kasein berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease dimana jika bakteri yang ditanam pada media susu skim merupakan bakteri proteolitik maka akan terbentuk zona jernih. Koloni yang membentuk zona jernih merupakan penghasil protease yang baik jika didapatkan diameter 12 mm atau lebih karena media susu skim yang mengandung kasein dapat menentukan kemampuan mikroorganisme dalam mensekresikan protease yang dapat mendegradasikan protein (Borla dkk., 2010; Ethica dkk., 2014;2017; 2018).

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Prinsip Kerja Alat PCR

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. PCR ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium menstimulasi aktivasi polimeras (Handayo, 2000).

Adapun prinsip dasar dari PCR yaitu:

1. Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi 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. Adapun waktu

denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada temperatur 92,5, 95 dan 97,5°C. waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada temperatur 92,5, 95 dan 97,5°C (Yusuf, 2010; Bangol dkk., 2014).

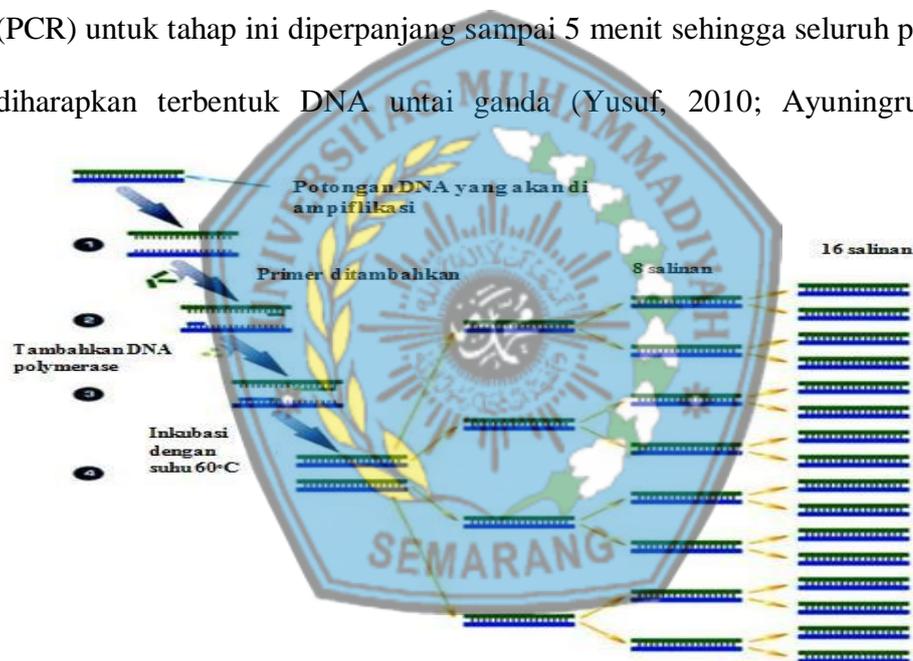
2. Annealing (Penempelan primer)

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 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. penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun temperatur yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C (Yusuf, 2010; Muharni dkk., 2015).

3. Ekstensi/Elongasi (Pemanjangan Primer)

Selama tahap ini Taq polimerase 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, 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 Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Yusuf, 2010; Ayuningrum, 2017).



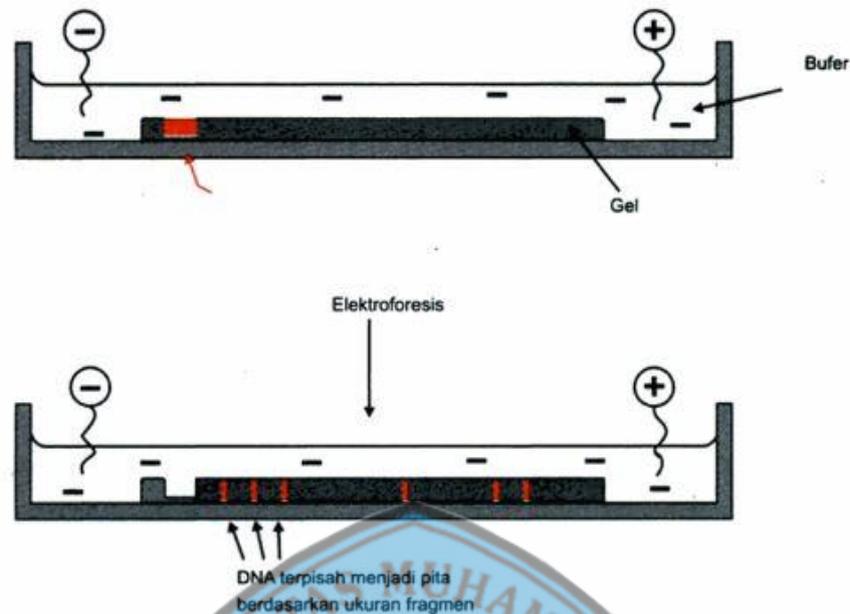
Gambar 2. Bagan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* (Sumber: Yusuf, 2010)

2.7 Gel Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (Titrawani, 1996). Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang

dikandung oleh makro-molekul tersebut. Bila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi (Pratiwi, 2001). Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (anode), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (anode) (Sudjadi, 2008).

Produk PCR (1500bp) divisualisasikan melalui elektroforesis pada 1% dari gel agarose dengan ethidium bromide yang langsung ditambahkan ke gel (Darmawati kk., 2014). 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. 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. 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 dan Cummings, 1994; Mastang, 2016).



Gambar 3. *Gel Elektroforesis* (Sumber: Sudjadi, 2008)

2.8 Sekuensing

Sekuensing adalah penentuan urutan basa DNA dalam segmen molekul DNA yang relatif pendek. Pengurutan (*sequencing*) asam nukleat memungkinkan kita mengetahui kode genetic dari molekul DNA. Sekuensing dapat digunakan untuk membedakan strain dari suatu mikroorganisme. Pada produk PCR yang telah dimurnikan ditentukan urutan nukleotidanya dengan metode sekuensing. Pada tahap sekuensing produk PCR dengan ukuran tertentu digunakan sebagai cetakan. Primer pada tahap PCR juga digunakan dalam sekuensing, hanya saja masing-masing primer digunakan secara terpisah dalam satu siklus sekuensing (*forward* saja atau *reverse* saja). Berbeda dengan PCR, produk yang dihasilkan dari sekuensing memiliki ukuran yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan karena pada sekuensing ditambahkan ddNTP (*di-deoxyribonuclease Triphosphat*) atau dNTP terminator yang dilabel dengan zat warna. Terminator ini pada satu siklus

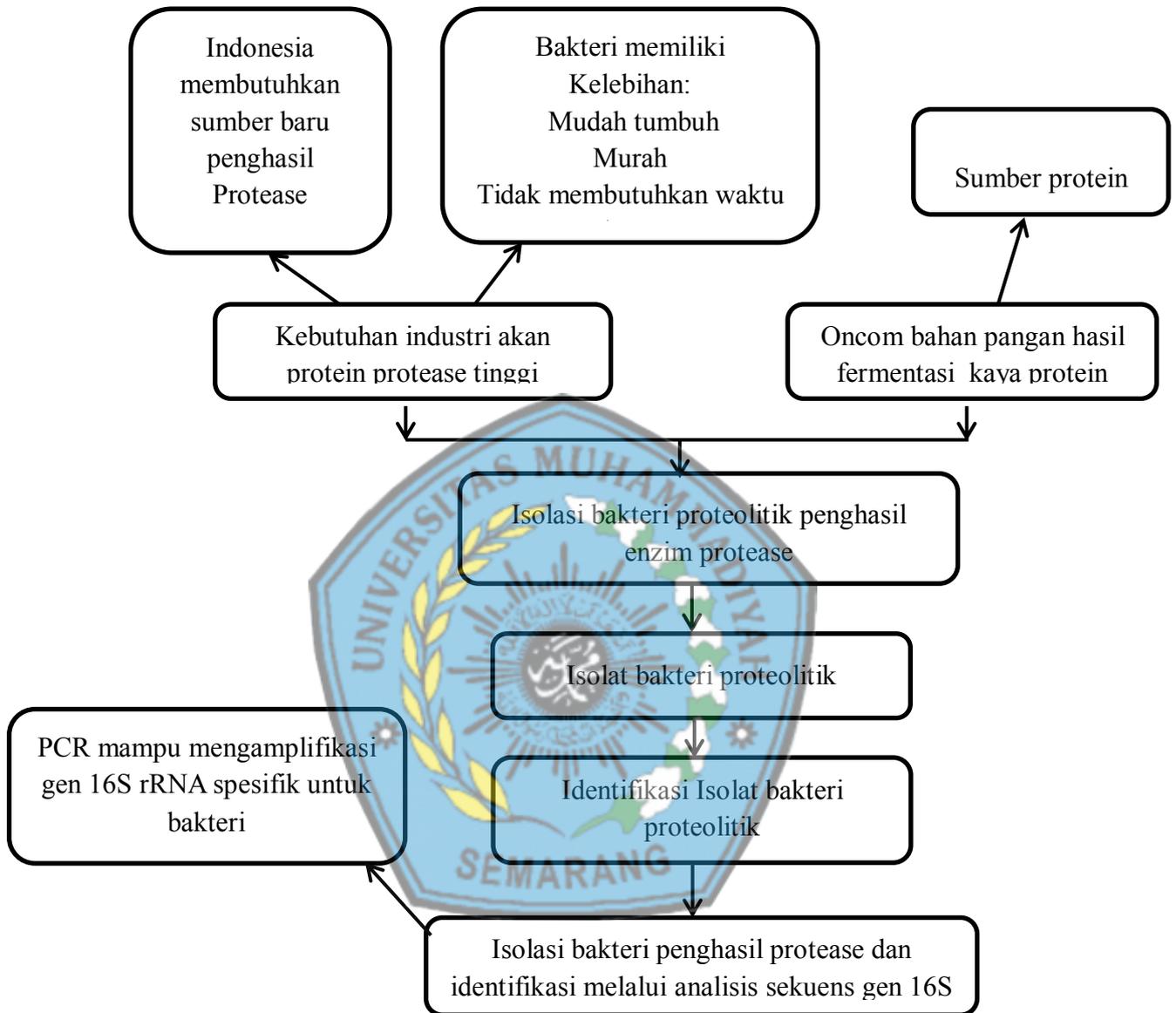
akan berikatan secara acak dan menghentikan proses pembacaan. Pada tiap basa terminator (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau ddTTP), terdapat zat warna fluoresen yang dapat menyerap panjang gelombang yang berbeda sehingga basa terminator akan dapat dibaca dengan fluorometri (Fatimawali, 2013; Rinanda, 2011).

Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer *reverse* dan *forward* dan umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (*consensus sequence*). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database menggunakan software tertentu. Beberapa sistem dapat menentukan urutan nukleotida melalui pembacaan satu primer, namun pembacaan dengan dua primer memberikan hasil yang lebih akurat (Rinanda, 2011).

Beberapa database yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens 16S rRNA antara lain:

- a) GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- b) Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>)
- c) Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)
- d) Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch>)
- e) Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>)

2.9 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori