

SKRIPSI

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PROTEOLITIK
DARI LIMBAH CAIR TAHU MENGGUNAKAN DNA
BARCODING GEN 16S rRNA**

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains
di Jurusan Biologi pada Fakultas MIPA**



OLEH

**RAGIL CAHYATI
08041281722037**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2021**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PROTEOLITIK
DARI LIMBAH CAIR TAHU MENGGUNAKAN DNA
BARCODING GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains
di Jurusan Biologi pada Fakultas MIPA

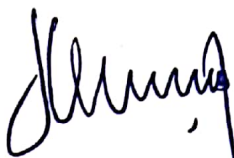
Oleh:

RAGIL CAHYATI

08041281722037

Indralaya, 31 Maret 2021

Pembimbing I



Dra. Muharni, M.Si.
NIP. 196306031992032001

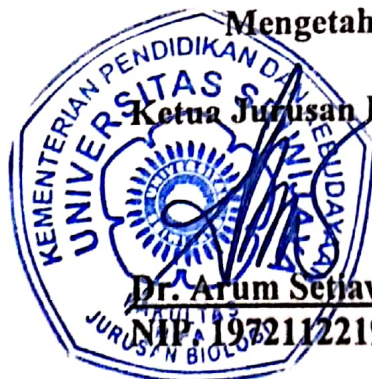
Pembimbing II



Dr. Laila Hanum, M.Si.
NIP. 197308311998022001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Dr. Arum Setiawan, M.Si.
NIP. 197211221998031001

HALAMAN PERSETUJUAN

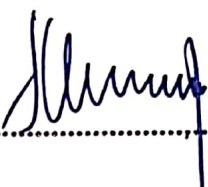
Karya tulis ilmiah berupa skripsi ini dengan judul "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tahu menggunakan DNA *Barcoding* Gen 16S rRNA" telah dipertahankan dihadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada tanggal 31 Maret 2021.

Indralaya, Maret 2021

Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah berupa Skripsi:

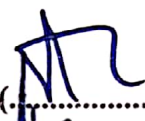

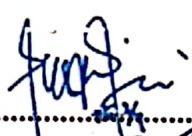

Ketua:

1. Dra. Muharni, M.Si.
NIP. 196306031992032001

(.....


Anggota:

2. Dr. Laila Hanum, M.Si.
NIP. 197308311998022001
3. Dr. Hary Widjajanti, M.Si.
NIP. 196112121987102001
4. Dr. Elisa Nurnawati, M.Si.
NIP. 197504272000122001
5. Doni Setiawan, S.Si, M.Si.
NIP. 198001082003121002

(.....

(.....

(.....

(.....


Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi


Dr. Arum Setiawan, M.Si.
NIP.197211221998031001



Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP.197111191997021001

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Menghina Tuhan tidak perlu dengan menginjak Al-Quran, atau mencaci Nabi. Anda risau skripsi Anda tidak selesaipun itu bentuk penghinaan terhadap Tuhan (asal dikerjakan)”

Saya persembahkan Skripsi ini untuk seluruh Mahasiswa yang sedang kebingungan mencari ide dalam per-skripsi-an, semoga karya ini bisa membantu kalian dalam menentukan topik penelitian, Saya saja bisa, kenapa Anda tidak?

Serta,

Gelar Sarjana Sains yang saya peroleh dari selesainya skripsi ini Saya persembahkan untuk Bapak Marsidi dan Ibu Hairunisyah.

HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Ragil Cahyati

NIM : 08041281722037

Judul : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tahu menggunakan DNA *Barcoding* Gen 16S rRNA

Menyatakan bahwa skripsi Saya merupakan hasil karya sendiri didampingi tim Pembimbing dan bukan merupakan hasil jiplakan atau plagiat. Apabila ditemukan unsur-unsur penjiplakan atau plagiat dalam skripsi ini, maka Saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Sriwijaya sesuai aturan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini Saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.



Indralaya, Maret 2021

Ragil Cahyati
NIM. 08041281722037

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Ragil Cahyati

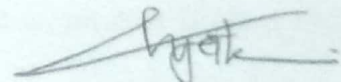
NIM : 08041281722037

Judul : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tahu menggunakan DNA *Barcoding* Gen 16S rRNA.

Memberikan izin kepada Pembimbing dan Universitas Sriwijaya untuk mempublikasikan hasil penelitian Saya untuk kepentingan akademik apabila dalam waktu 1 (satu) tahun tidak mempublikasikan karya penelitian Saya. Dalam kasus ini Saya setuju untuk menempatkan Pembimbing sebagai penulis korespondensi (*Corresponding author*).

Demikian pernyataan ini Saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa paksaan dari siapa pun.

Indralaya, Maret 2021



Ragil Cahyati
NIM.08041281722037

KATA PENGANTAR

Ahamdulillah, segala puji bagi Allah SWT yang masih memberikan nikmat kehidupan sehingga penulis mampu menyusun tugas akhir dalam bentuk skripsi dengan judul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tahu menggunakan DNA *Barcoding* Gen 16S rRNA” ini. Skripsi ini ditulis sebagai salah satu pemenuhan syarat memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya.

Seluruh kendala yang penulis hadapi tidak akan mampu terlewat dengan mudah tanpa bantuan Ibu Dra. Muharni, M.Si., selaku dosen pembimbing pertama dan Ibu Dr. Laila Hanum, M.Si., selaku dosen pembimbing kedua yang dengan sabar memberi masukan, saran, dan bantuan selama proses penelitian dan penyusunan tugas akhir penulis serta dengan ikhlas memberikan waktu luangnya untuk mengoreksi hal-hal yang masih keliru dalam tulisan ini. Penulis memohon maaf jika selama masa penyusunan Skripsi ini penulis banyak melakukan hal-hal yang kurang berkenan dihati Ibu sekalian.

Ucapan terima kasih yang tulus juga penulis sampaikan kepada yang terhormat:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. H. Anis Saggaf, MSCE. selaku rektor Universitas Sriwijaya.
2. Bapak Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika Universitas Sriwijaya.
3. Bapak Dr. Arum Setiawan, M.Si., selaku ketua jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya.
4. Bapak Dr. Sarno, M.Si., selaku sekretaris Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya yang telah memberikan izin untuk dapat melaksanakan penelitian di laboratorium.
5. Ibu Prof. Dr. Hilda Zulkifli, M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan motivasi selama proses studi di Jurusan Biologi.
6. Ibu Dr. Hary Widjajanti, M.Si. selaku dosen penguji pertama, dan ibu Dr. Elisa Nurnawati, M.Si., selaku dosen penguji kedua yang telah

memberikan banyak masukan dan saran serta motivasi untuk menyusun skripsi dengan sebaik-baiknya. Mohon maaf jika selama proses penyusunan skripsi ada banyak hal yang penulis lakukan dan kurang berkenan dihati Ibu sekalian.

7. Bapak Doni Setiawan, M.Si. selaku dosen penguji pada sidang skripsi, penulis ucapkan terima kasih atas kesediaan menghadiri sidang skripsi penulis.
8. Seluruh staf dosen dan pegawai di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya yang banyak membantu dalam proses perkuliahan hingga akhir masa studi.
9. Ibu Rosmania, S.T., dan kak Agus Wahyudi, S.Si. selaku analis laboratorium Mikrobiologi dan analis laboratorium Bioteknologi dan Genetika Jurusan Biologi. Ucapan permintaan maaf juga penulis sampaikan untuk sikap dan perbuatan penulis yang kurang berkenan dihati.
10. Seluruh rekan-rekan seperjuangan Biologi angkatan 2017 yang selalu memberi semangat dan bantuan serta masukan selama proses penyusunan tugas akhir penulis.
11. Terkhusus manusia-manusia super yang selalu bisa diandalkan: kak Ogi Dwi Saputra, S.Si., Jesty Intan Ruary, Alimatussya'adah, Reisti Aan Savitri, S.Kep. dan Ulyy Febra Kusuma, S.Ked. terimakasih telah membersamai sampai sejauh ini.

Skripsi ini masih sangat jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan masukan yang akan membangun dan memperbaiki tulisan penulis dikemudian hari. Akhir kata, semoga setiap kata yang tertulis dalam skripsi ini dapat menyumbang perkembangan ilmu pengetahuan dan menjadi sumber inspirasi bagi penulis berikutnya.

Indralaya, Maret 2021

Ragil Cahyati

RINGKASAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tahu dengan Menggunakan DNA *Barcoding* Gen 16S rRNA

Karya Tulis Ilmiah berupa Skripsi, Maret 2021

Ragil Cahyati; Dibimbing oleh Dra. Muharni, M.Si.

Dr. Laila Hanum, M.Si.

Isolation and Identification of Proteolytic Bacteria in Tofu Wastewater using DNA Barcoding 16S rRNA Gene

xi + 46 halaman, 6 tabel, 8 gambar, 3 lampiran

RINGKASAN

Kandungan protein dalam limbah cair tahu diketahui masih sangat tinggi, yaitu 20,74% dari total keseluruhan bahan organik dalam limbah cair tahu. Kandungan protein yang tinggi akan diuraikan oleh bakteri indigen yang menghasilkan protease (bakteri proteolitik) untuk memecah protein dalam limbah. Enzim protease merupakan enzim yang paling banyak (59%) digunakan di dunia. Bakteri proteolitik dalam limbah cair tahu berpotensi menjadi sumber protease asal bakteri. Isolasi dan Identifikasi bakteri proteolitik dari limbah cair tahu menggunakan DNA *barcoding* gen 16S rRNA dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat isolat bakteri proteolitik dalam limbah cair tahu, serta mengetahui jenis sekaligus kekerabatan isolat bakteri proteolitik. Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2020 sampai dengan Januari 2021 di laboratorium genetika dan bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA Unsri. Sampel diperoleh dari pabrik tahu dan tempe Dokado Kecamatan Indaralaya Kabupaten Ogan Ilir. Metode yang digunakan terdiri dari tahap isolasi dan skrining bakteri proteolitik, uji indeks hidrolisis protein, ekstraksi DNA bakteri proteolitik, amplifikasi gen 16S rRNA, sekuensing, serta analisis hasil sekuensing dan konstruksi pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan terdapat empat isolat positif dari limbah cair tahu yaitu RCP_01, RCP_02, RCP_03, dan RCP_04. Berdasarkan hasil analisis BLAST yang dilanjutkan dengan analisis hubungan kekerabatan (filogenetik) diketahui bahwa isolat RCP_01 memiliki hubungan kekerabatan dan kemiripan yang sangat dekat dengan bakteri jenis *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 10145, isolat RCP_02 memiliki kemiripan dengan bakteri jenis *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 tetapi tidak berkerabat dekat, dan isolat RCP_03 memiliki kemiripan dan kekerabatan yang erat dengan bakteri *Bacillus flexus* strain IFO15715 serta isolat RCP_04 berkerabat sangat dekat dan kemiripan yang tinggi dengan bakteri jenis *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098.

Kata kunci: bakteri proteolitik, filogenetik, limbah cair tahu.

Kepustakaan: 83 (1991 – 2020)

SUMMARY

Isolation and Identification of Proteolytic Bacteria in Tofu Wastewater using DNA Barcoding 16S rRNA Gene

Scientific paper of Undergraduate Thesis, March 2021

Ragil Cahyati; Supervised by Dra. Muharni, M.Si.

Dr. Laila Hanum, M.Si.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Proteolitik dari Limbah Cair Tahu dengan Menggunakan DNA *Barcoding* Gen 16S rRNA

xi + 46 pages, 6 tables, 8 pictures, 3 attachments

SUMMARY

Tofu wastewater contain high of protein which 20,74% in concentration. Protein in tofu wastewater will be breakdown by indigenous bacteria which produce of protease (proteolytic bacteria). Protease enzyme is the most used (59%) enzyme in the world. Proteolytic bacteria in wastewater of tofu have a good potential as a bacterial protease source. Isolation and Identification of proteolytic bacteria using DNA barcoding 16S rRNA gene used to know what kind of proteolytic bacteria in tofu wastewaer and the kinship of each other. The research have done on November 2020 until January 2021, in Laboratory of Genetic and Biotechnology, Biology Departmen, Faculty of Natural Science, Unsri. Sample were obtained from Dokado's tempeh and tofu industry, Indaralaya, Ogan Ilir. The methodology that used in this research include isolation and screening proteolytic bacteria, hidrolisis protein indeks measurement, DNA extraction, amplified 16S rRNA gene segmen, sequence anyalized, and constructed phylogeny tree. This research has been discovered four proteolytic bacteria isolate there are RCP_01, RCP_02, RCP_03, dan RCP_04. Based on BLAST analyzed and continued to phylogenetic analyze it was known that RCP_01 isolate has closer kinship with *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 10145 and high similiar with, RCP_02 high similiar enough with *Bacillus nitratireducens* strain MCCC 1A00732 but didn't has closer kinship. RCP_03 isolate has high similiar and close kinship with *Bacillus flexus* strain IFO15715. Isolate RCP_04 as known has high similiar and close kinship relation with *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098.

Keyword: proteolytic bacteria, phylogenetic, tofu wastewater.

Citation: 83 (1991 – 2020)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
KATA PENGANTAR	vii
RINGKASAN	ix
<i>SUMMARY</i>	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Limbah Cair Tahu	5
2.2 Enzim Protease	6
2.3 Bakteri Indigen pada Limbah Cair Tahu	8
2.4 Jenis-Jenis Bakteri Penghasil Protease	9
2.5 DNA <i>Barcoding</i>	9
2.6 Gen 16S rRNA	10
2.7 <i>Polymerase Chain Reaction</i>	12
2.8 Elektroforesis Agarose	13

2.9 Analisis Filogenetik.....	13
BAB III METODE PENELITIAN	15
3.1 Waktu dan Tempat	15
3.2 Alat dan Bahan.....	15
3.2.1 Alat	15
3.2.2 Bahan	15
3.3 Cara Kerja	16
3.3.1 Pengambilan Sampel	16
3.3.2 Skrining, Isolasi, dan Pemurnian Bakteri Proteolitik	16
3.3.3 Pengamatan Morfologi Bakteri	17
3.3.4 Uji Aktivitas Proteolitik.....	17
3.3.5 Ekstraksi DNA Bakteri Proteolitik	18
3.3.6 Amplifikasi Gen 16S rRNA	18
3.3.7 Elektroforesis	19
3.3.8 Sekuensing	19
3.3.9 Analisis BLAST dan Konstruksi Pohon Filogenetik.....	19
3.3.10 Analisis Data	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri Proteolitik.....	21
4.2 Ekstraksi DNA Genom Bakteri Proteolitik	24
4.3 Amplifikasi Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Proteolitik.....	26
4.4 Identifikasi dan Analisis Kekerbatan Isolat Bakteri Proteolitik ...	27
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	36
5.1 Simpulan	36
5.2 Saran	36
Daftar Pustaka	37
Lampiran	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1. Daftar primer yang digunakan	13
Tabel 4.1. Karakter fenotipik isolat bakteri positif proteolitik	21
Tabel 4.2. Nilai Indeks Hidrolisis Protein (IHP) bakteri proteolitik	23
Tabel 4.3. Konsentrasi DNA genom hasil ekstraksi isolat bakteri proteolitik ...	24
Tabel 4.4. Hasil Identifikasi dengan teknik BLAST	28

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 4.1. Bentuk sel dan sifat gram bakteri proteolitik	22
Gambar 4.2. Uji aktivitas hidrolisis protein isolat bakteri proteolitik	24
Gambar 4.3. Elektroferogram hasil ekstraksi DNA bakteri	25
Gambar 4.4. Elektroferogram hasil PCR gen 16S rRNA bakteri proteolitik	27
Gambar 4.5. Pohon filogenetik isolat RCP_01	29
Gambar 4.6. Pohon filogenetik isolat RCP_02	31
Gambar 4.7. Pohon filogenetik isolat RCP_03	33
Gambar 4.8. Pohon filogenetik isolat RCP_04	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi media susu skim agar.....	44
Lampiran 2. Komposisi buffer TBE	44
Lampiran 3. Hasil <i>multiple sequence alignment</i>	45

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Proses produksi tahu tidak terlepas dari limbah yang dihasilkan. Mayoritas pabrik pembuatan tahu masih menjalankan industrinya dalam skala rumahan dan dengan teknologi sederhana serta limbah yang dihasilkan dibuang langsung ke badan perairan tanpa pengolahan. Teknologi sederhana yang digunakan dalam pembuatan tahu cenderung menghasilkan limbah dalam konsentrasi bahan organik yang masih tinggi. Tingginya kandungan bahan organik pada limbah cair tahu berpotensi sebagai salah satu sumber cemaran pada badan perairan. Angka BOD pada limbah cair tahu dapat mencapai 5000 – 10000 mg/L. Limbah cair tahu yang dibuang langsung ke badan perairan dapat menurunkan daya dukung lingkungan pada perairan tersebut (Hendrasari, 2016).

Bahan organik dalam limbah cair tahu yang cukup tinggi salah satunya adalah protein. Kadar protein dalam limbah cair tahu diketahui mencapai 20,74% dari jumlah keseluruhan bahan organik dalam limbah yang dihasilkan (Asril *et al.*, 2019). Tingginya kadar protein pada limbah tahu dibuktikan juga pada penelitian yang dilakukan oleh Damayanti *et al.* (2004), dimana angka N-total dalam limbah air tahu adalah sebesar 161,5 mg/L. Tingginya kadar N-total pada limbah cair tahu mengakibatkan aroma amonia yang kuat.

Limbah cair tahu yang masih mengandung protein dalam kadar tinggi menjadi sumber senyawa N yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme yang dapat tumbuh dalam limbah cair tahu biasanya adalah bakteri indigen yang mendegradasi protein dari limbah. Bakteri pendegradasi protein memiliki enzim protease yang dapat memecah polimer protein menjadi monomer-monomer yang lebih sederhana. Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Fatoni *et al.* (2008), limbah cair tahu telah diketahui mengandung enzim protease ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri dari jenis *Staphylococcus* sp.

Protease merupakan salah satu enzim yang paling banyak digunakan dalam industri dan telah banyak dikomersilkan. Lima puluh sembilan persen dari total penjualan enzim di dunia adalah penjualan enzim protease. Protease yang digunakan dalam industri biasanya dimanfaatkan untuk memecah protein daging pada pengolahan sosis kering, menghasilkan peptida bioaktif, serta dapat meningkatkan sifat-sifat organoleptik produk olahan (Purnomo, 2012). Pemanfaatan protease secara luas dapat membuka peluang baru dalam produksi protease dengan kemampuan dan karakteristik yang khas sesuai dengan kebutuhan pasar.

Protease asal bakteri lebih banyak dimanfaatkan dalam bidang industri dibandingkan dengan protease asal hewan dan tumbuhan. Enzim protease asal mikroba digunakan lebih luas dibandingkan dengan protease asal hewan dan tumbuhan yang pemanfaatannya masih sering terkendala oleh faktor eksternal seperti suhu maupun derajat keasaman. Keuntungan lain dari protease asal mikroba adalah produksi yang lebih menguntungkan bagi lingkungan karena sangat sedikit menghasilkan limbah yang bahkan dapat dimanfaatkan kembali menjadi kompos (Hamza, 2017).

Produksi enzim protease dari mikroba memerlukan substrat khusus yang mampu menjadi sumber bahan organik untuk metabolisme sel. Pemilihan substrat untuk produksi enzim protease didasari atas kelimpahan sumber protein yang tinggi, serta biaya yang relatif murah dan mudah diperoleh. Produksi enzim protease dapat diinduksi dengan senyawa nitrogen sederhana dimana limbah cair tahu yang kaya akan protein mampu menjadi salah satu alternatif substrat untuk produksi protease secara masal. Hasil penelitian menyebutkan bahwa kombinasi antara dedak dan limbah cair tahu diketahui mampu meningkatkan produksi protease hingga tiga kali lipat dibandingkan dengan substrat 200 ml susu kedelai dalam satu liter akuades (Naiola dan Widhyastuti, 2002).

Penentuan bakteri dari alam yang berpotensi sebagai sumber enzim protease dapat diisolasi dari lokasi yang menjadi asumsi bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan sumber nutrisi yang berhubungan (Waites *et al.*, 2001).

Kandungan protein dalam limbah cari tahu yang masih tinggi berpotensi sebagai salah satu sumber nutrisi yang dimanfaatkan oleh bakteri proteolitik.

Identifikasi bakteri proteolitik perlu dilakukan secara spesifik dan akurat. Identifikasi yang spesifik dan akurat dapat dilakukan dengan pendekatan genotipik. Pendekatan genotipik untuk mengidentifikasi jenis bakteri proteolitik dapat menggunakan teknik DNA *barcoding*. DNA *barcoding* memanfaatkan gen yang spesifik dan unik dalam suatu individu untuk dianalisis guna mengetahui jenis individu yang diidentifikasi (Effendi, 2020). Teknik identifikasi dengan DNA *barcoding* pada bakteri menggunakan gen 16S rRNA. Urutan gen 16S rRNA digunakan sebagai karakter identifikasi bakteri dengan pendekatan genotip dalam metode DNA *barcoding* (Trivedi *et al.*, 2018).

Gen 16S rRNA dipilih sebagai biomarker dalam identifikasi jenis karena memiliki beberapa keunggulan. Gen 16S rRNA terdapat pada seluruh jenis bakteri, serta tiap-tiap jenis memiliki urutan yang berbeda (variatif). Dengan menggunakan urutan gen 16S rRNA memungkinkan jenis baru dapat teridentifikasi karena urutan basa yang variatif. Gen 16S rRNA juga sekaligus dapat digunakan dalam konstruksi filogenetik karena memiliki area gen yang konservatif. Penggunaan gen 16S rRNA juga dapat diaplikasikan langsung pada bakteri yang sulit ditumbuhkan (Tang dan Stratton, 2006). Pendekatan secara molekuler dengan menggunakan marker gen 16S rRNA telah dijadikan standar dalam identifikasi bakteri menggunakan karakter genotip (Nurhayati, 2018). Didasari oleh hal itulah maka penelitian ini akan mengidentifikasi bakteri proteolitik dalam limbah cair tahu menggunakan gen 16S rRNA.

1.2 Rumusan Masalah

Limbah cair tahu masih memiliki kandungan protein yang tinggi sehingga dapat mencemari lingkungan. Kandungan protein yang tinggi berpotensi dijadikan sebagai substrat untuk produksi protease, sehingga perlu dilakukan isolasi bakteri indigen yang memiliki aktifitas proteolitik serta identifikasi terhadap isolat tersebut dan mencari hubungan kekerabatannya.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mendapatkan isolat bakteri proteolitik dalam limbah cair tahu.
2. Mengetahui jenis isolat bakteri proteolitik dalam limbah cair tahu berdasarkan analisis sekuens gen 16S rRNA sekaligus konstruksi pohon filogenetiknya.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini diharapkan mampu menjadi sumber data mengenai jenis bakteri proteolitik yang terdapat dalam limbah cair tahu, serta dapat menjadi salah satu rujukan dalam upaya pengembangan teknologi produksi protease dari bakteri dengan menggunakan substrat limbah cair tahu.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S. Z., Yong, Y., Khan, M. A., Siddiqui, M. R., Hakami, A. A. H., Alshareef S. A., Otero, M., Rafatullah M. 2020. Biofloculants Produced by Bacterial Strains Isolated from Palm Oil Mill Effluent for Application in the Removal of Eriochrome Black T Dye from Water. *Polymers* 2020. 12 (1545): 1 – 12.
- Aguilar. J. G. S., Castro, R. J. S., dan Sato, H. H. 2019. Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* LBA 46 in A Bench Reactor: Effect Of Temperature and Agitation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 36 (2): 615 – 625.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil. *Proceeding of ITB Engineering Science*. 9 (2): 129 – 159.
- Asril, M., Oktaviani, I., dan Leksikowati, S. S. 2019. Isolasi Bakteri Indigenous dari Limbah Cair Tahu dalam Mendegradasi Protein dan Melarutkan Fosfat. *Jurnal Teknologi Lingkungan*. 20 (1): 67 – 72.
- Asyhari, A., Yunus, M. R., Haryani, A. D., dan Handayani, M. 2014. The Potential Use of Tofu-Processing Wastewater as Bacterial Growth Media for Soil Structure Improvement by Bioclogging And Biocementation. *Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation*, 4 (2). 47 – 58.
- Angraini, Sutisna, M., dan Pratama, Y. 2014. Pengolahan Limbah Cair Tahu secara Anaerob menggunakan Sistem Batch. *Jurnal Institut Teknologi Nasional*. 2 (1): 1 – 10.
- Baum, D. A., dan Smith, S. D. 2013. *Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology*. Greenwood Village: Roberts and Company Publisher. Inc. xiii + 494 hlm.
- Brix, K., dan Stocker, W (eds). 2013. *Protease: Structure and Function*. New York: Springer Wien Heidelberg. xi + 564 hlm.
- Brown, A., dan Heidi S. 2015. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology Thirteenth Edition*. New York: McGraw-Hill Education. 481 hlm.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2008. SNI 6989.59:2008. Air dan air limbah – Bagian 59: Metoda Pengambilan Contoh Air Limbah. Badan Standardisasi Nasional: Jakarta.
- Cappuccino, G. dan Welsh, C. 2018. *Microbiology A Laboratory Manual Eleventh Edition*. Edinburgh Gate: Pearson Education. 561 hlm.
- Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., dan Hyde, K. D. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. (1): 55 – 66.

- Claridge, E. J. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Review*. 17 (4): 840 – 862.
- Donkor, E. S., Dayie, N. T. K. D., dan Adiku, T. K. 2014. Bioinformatic with Basic Local Alignment Tool (BLAST) and Fast Alignmen (FASTA). *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*. 6 (1): 1 – 9.
- Damayanti, A., Hermana, J., dan Masduqi, A. 2004. Analisis Resiko Lingkungan dari Pengolahan Limbah Pabrik Tahu dengan Kayu Apu (*Pistia stratiote* L.). *jurnal Purifikasi*. 5 (4): 151 – 156.
- Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M., dan Roosen, N. H. C. 2020. Genetically Modified Micro-Organism for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods*. 9 (326): 1 – 20.
- Desjardins, P., dan Conklin, D. 2010. Nano Drop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp.* 45 (e2565): 1 – 4.
- Dharmayanti, N. L. P. I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*. 21 (1): 1 – 10.
- Durham, D. R., Stewart, D. B., dan Stellwag, E. J. 1987. Novel Alkaline-and Heat-Stable Serine Protease from Alkalophilic *Bacillus* sp. Strain GX6638. *Journal of Bacteriology*. 169 (6): 2762 – 2768.
- Effendi, I. 2020. *Metode Identifikasi dan Klasifikasi Bakteri*. Pekanbaru: Oceanum Press. vii + 142 hlm.
- Fatoni, A., Zufahair, dan Lestari, P. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu. *Jurnal Natur Indonesia*. 10 (2): 83 – 88.
- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle*.
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., dan Saito, M. 2016. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal OUEH*. 38 (3): 223 – 232.
- Goldman, E., dan Lorrence, H. G. 2009. *Practical Handbook of Microbiology*. Boca Raton: CRC Press by Taylor & Francis Group. xx + 856 hlm.
- Hall, B. G. 2018. *Phylogenetic Trees Made Easy*. New York: Oxford University Press. xvi + 353 hlm.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95 – 98.

- Hamza, T. A. 2017. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*. 3 (1): 1 – 10.
- Handoyo, D., dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*. 9 (1): 17 – 29.
- Harahap, M. R. 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*. 2 (1): 21 – 26.
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*. 25 (1): 31 – 41.
- Hendrasari, R. S. 2016. Kajian Penurunan Kadar BOD Limbah Cair Tahu Pada Berbagai Variasi Aliran. *Jurnal Ilmiah Semesta Teknika*. 19 (1): 26 – 36.
- Horiike, T. 2016. An Introduction to Molecular Phylogenetic Analysis. *Reviews in Agricultural Science*. 4: 36 – 45.
- Jaziri, A. A., Ahmad, N. R., Firdaus, M., dan Sukoso, S. 2017. Karakteristik Protease dari Ekstrak Kasar Khamir Laut dan Aktivitasnya dalam Menghidrolisis Protein Ikan Rucah. *Journal of Fisheries and Marine Science*. 1 (2): 78 – 87.
- Jebeli, M. A., Maleki, A., Amoozegar, M. A., Kalantar, E., Izanloo, H., dan Gharibi, F. 2017. *Bacillus flexus* strain As-12, A New Arsenic Transformer Bacterium Isolated from Contaminated Water Resource. *Chemosphere*. 169 (2017): 636 – 641.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B., Petersen, L. M., Demkowics, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., Weinstock G. M. 2019. Evaluation of 16S rRNA Gene Sequencing for Species and Strain-Level Microbiome Analysis. *Nat commun* 10, 5029 (2019).
- Kaur, I., Kocher, G. S., dan Gupta, V. K. 2012. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene for an Alkaline Protease from *Bacillus circulans* MTCC 7906. *Indian Journal Microbiol*. 52 (4): 630 – 637.
- Ken, R. R., Jati, A. W. N., dan Yulianti, L. L. M. 2019. Peranan Bakteri Indigenus dalam Degradasi Limbah Cair Pabrik Tahu (*The Role of Indigenous Bacteria in Degrading Liquid Waste of Tofu Production*). *Biota*. 4 (1): 8 – 15.
- Kerster, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., dan Schleifer, K. 1996. Recent Changes in the Classification of the Pseudomonas. *System.Appl.Microbiol*. 19 (4): 465 – 477.
- Lan, V. T. T., Loan, T. T. L., Duong, P. A. T., Thanh, L. T., Ha, N. G., dan Thuan, T. B. 2012. Straightforward Procedure for Laboratory

- Production of DNA Ladder. *Journal of Nucleic Acid*. 2012. Article ID: 254630. Hal: 1 – 4.
- Lee, P. Y., Costumbrado J., Hsu, C. Y., dan Kim, Y. H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* 62 (e3923): 1 – 5.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., dan Shao, Z . 2017. Proposal of Nine Novel Species of the *Bacillus cereus* Group. *Int. J. Syst Evol Microbiol.* 67 (8): 2499 – 2508.
- Marathe, S. K., Vashistht, M. A., Prashanth, A., Parveen, N., Chakraborty, S., dan Nair, S., S. 2018. Isolation, Partial Purification, Biochemical Characterization and Detergent Compatibility of Alkaline Protease Produced by *Bacillus Subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from Sea Water Samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* 16 (1): 39 – 46.
- Maristiasa, N. P., Wardoyo, F. A., Darmawati, S., dan Ethica S. N. 2019. Isolasi dan Uji Tingkat Patogenitas Bakteri Proteolitik untuk Bioremediasi Limbah Industri Tahu. *Prosiding Mahasiswa Seminar Nasional Unimus.* Vol 2 (2019): 164 – 170.
- Michu, E. 2007. A Short Guide to Phylogeny Reconstruction. *Plant soil environ.* 53 (10): 442 – 446.
- Mienda, B. S., Yahya, A., dan Shamsir, M. S. 2014. An Overview of Microbial Proteases for Industrial Applications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 5 (1): 388 – 396.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika Edisi kedua*. Bogor: IPB Press. ix + 142 hlm.
- Mohamadou, B., Mbofung, C. M., dan Barbier, G. 2013. Genotypic and Phenotypic Diversity among *Bacillus* Species Isolated from Mbuja, a Cameroonian Traditional Fermented Condiment. *African Journal of Biotechnology.* 12 (12): 1335 – 1343.
- Najafi, M. F., Deobagkar, D., dan Deobagkar D. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Bacteriology.* 8 (2): 197 – 203.
- Naiola, E., dan Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi.* 6 (3): 467 – 473.
- Nierhause, K. H., dan Wilson, D (eds). 2004. *Portein Sintesis and Ribosome Structure Translating the Genome*. Weinhem: Wiley-HCV Verlag GmbH & Co. KgaA. xviii + 583 hlm.
- Noviyanti, N. P., Suastuti, D. A., Suantini, N. M. 2017. Pemanfaatan Mikroorganisme Limbah Cair Tahu dalam Menurunkan Nilai COD dan BOD pada Limbah Cair Hotel. *Jurnal Media Sains.* 1 (2): 45 – 49.

- Nurhayati. 2018. Analysis of 16S rRNA for Identification of New Bacteria. *International Semonar on Education and Development of Asia (INseIDEA)*. Disampaikan tanggal 14 Juli 2018.
- Pangastuti, A. 2006. Review: Definisi Spesies Prokaryota berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*. 7 (3): 292 – 296.
- Pei, A., Nossa, C. W., Chokshi, P., Blaser, M. J., Yang, L., Rosmarin, D. M., dan Pei, S. 2009. Diversity of 23S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Plos One*. 4 (5): 1 – 9.
- Pelt-Verkuil, E., Belkum, A., dan Hays, J. P. 2008. *Principle and Technical Aspect of PCR Amplification*. Berlin: Springer Science + Business Media B. V. xii + 330 hlm.
- Puspitasari, F. D, Shovitri, M., dan Kuswytasari, N. D. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangki Septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 1 (1): 1 – 4.
- Rahayu, M., dan Susanti, E. 2017. Optimasi Jenis dan Kadar Sumber Nitrogen serta pH Medium untuk Produksi Protease dari Isolat Htcum 6.2.2 dari Tauco Surabaya. *Jurnal Kimia Riset*. 2 (2): 98 – 107.
- Rajilic-Stojanovic, M., dan Willem, M. 2014. Review Articiel The First 1000 Cultured Species of The Human Gastrointestinal Microbiota. *FEMS Microbiol Rev*. 38 (2014): 996 – 1047.
- Ratnani, R. D. 2012. Kemampuan Kombinasi Eceng Gondok dan Lumpur Aktif Untuk Menurunkan Pencemaran pada Limbah Cair Industri Tahu. *Momentum*. 8 (1): 1 – 5.
- Razzaq, A., Shamsi S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., dan Ashraf, M. 2019. Microbial Protease Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 7 (110): 1 – 20.
- Ren, J., Wang, C., Huhetaoli, Li, C., Fan, B., dan Niu, D. 2020. Biodegradation of Acephate by *Bacillus paramycoides* NDZ and Its Degradation Pathway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36 (155): 1 – 11.
- Sadeghi, H. M. M., Rabbani, M., dan Naghitorabi, M. 2009. Cloning of Alkaline Protease Gene from *Bacillus subtilis* 168. *Pharmaceutical Science*. 4 (1): 43 – 46.
- Safitri, R., Muchlissin, S. I., Mukaromah, A. H., Darmawati, S., dan Ethica, S. N. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus thuringiensis* Irodi pada Oncom Merah pasca Fermentasi 24 Jam. *Seminar Nasional Edusaintek*. FMIPA Unimus, Semarang. Halaman 62 – 69.
- Saitou, N., dan Nei, M. 1987. The Neighbour-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylgenetic Trees. *Mol. Biol. Evol*. 4 (4): 406 – 425.

- Sajuthi, D., Suparto, I., Yanti, dan Praira, W. 2010. Purifikasi dan Pencirian Enzim Protease Fibrinolitik dari Ekstrak Jamur Merang. *Makara, Sains*. 14 (2): 145 – 150.
- Salleh, A. B., Rahman, R. N. Z. R. A., dan Basri, M. 2006. *New Lipases and Proteases*. New York: Nova Science Publishers Inc. vii + 159 hlm.
- Sanger, F., Nicklen S., dan Coulson, A. R. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USAI*. 74 (12): 5436 – 5476.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., dan Muhimmah, I. 2014. Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *SNIMed*. Diselenggarakan di Universitas Islam Indonesia 6 – 3 Desember 2014.
- Sayow, F., Polii, B. V. J., Tilaar, W., dan Augustine, K. D. 2020. Analisis Kandungan Limbah Industri Tahu dan Tempe Rahayu di Kelurahan Uner Kecamatan Kawangkoan Kabupaten Minahasa. *Agri-SosioEkonomi UNSRAT*. 16 (2): 245 – 252.
- Stover, N. A, dan Cavalcanti, A. R. O. 2017. Using NCBI BLAST. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. (halaman 11.1.1 – 11.1.34). Wiley online library.
- Subekti, S. 2011. Pengolahan Limbah Cair Tahu menjadi Biogas sebagai Bahan Bakar Alternatif. *Prosiding Seminar Sains dan Teknologi ke-21 Tahun 2011 Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang*.
- Susanti, R., dan Fidia, F. 2017. *Teknologi Enzim*. Yogyakarta: CV. Andi Offset. ix + 197.
- Tambekar, D.H., Tambekar, S., dan Jadhao, M.R. 2015. Partial Characterization of Protease from *Bacillus flexus*. *Science Research Reporter*. 5 (1): 92 – 96.
- Tang, Y., dan Stratton, C. W (eds). 2006. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. New York: Springer Science + Business Media Ltd. xv + 540 hlm.
- Trivedi, S., Rehman, H., Saggi, S., Panneerselvam, C., dan Gosh, S. K (eds). 2018. *DNA Barcoding and Molecular Phylogeny*. Switzerland: Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. vii + 442 hlm.
- Prajapati, V., Kareen, H. D., Prajapati, P. H., Sen, D. J., dan Patel, C. N. 2018. Chemistry and Histochemistry of Gram Staining of Dyes on Bacterial Peptidoglycan. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (16): 49-0 – 535.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., dan Higon, G. 2001. *Industrial Microbiology: an Introduction*. Oxford: Black Well Science Ltd. xi + 304 hlm.

- Ward, OP. 2011. Proteases. Dalam Murray M, editor. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition) Volume 3*. Halaman 571 – 582. Canada: Academic press.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., dan Lane, D. J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173 (2): 697 – 703.
- Witari, A. S., dan Nurika, I. 2016. Potensi Isolat Bakteri Asidogenik yang Mampu Menghasilkan Total Asam Tertinggi dari Limbah Cair Tahu. *Jurnal Teknologi dan Manajemen Agroindustri*. 5 (1): 9 – 20.
- Wilson, K., dan Walker, J (eds). 2010. *Principle and Technique of Biochemistry and Molecular Biology Sixth Edition*. New York: Cambridge University Press. xvii + 769 hlm.
- Yohandini, H., Muharni, dan Anggraini, M. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termo-Lipolitik dengan Pendekatan Biologi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA. *Prosiding Semirata 2015 Bidang MIPA BKS-PTN Barat*, Pontianak. Halaman 95 – 104.
- Yudhistira, B., Andriani, M., dan Utami, R. 2016. Karakterisasi: Limbah Cair Tahu dengan Koagulan yang Berbeda (Asam Asetat dan Kalsium Sulfat). *Caraka Tani – Journal of Sustainable Agriculture*. 31 (2): 137 – 14.