

AMOBILISASI PROTEASE DARI *Bacillus* sp. BT 1 MENGGUNAKAN POLIAKRILAMIDA

Zusfahair* dan Amin Fatoni

Program Studi Kimia Jurusan MIPA Fakultas Sains dan Teknik
Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto
Jl. Soeparno 62, Karangwangkal, Purwokerto Jawa Tengah 53123
e-mail: zusfahair@gmail.com

ABSTRAK

Penggunaan protease pada umumnya, dalam bentuk enzim bebas yang hanya sekali pakai, sehingga biaya produksi yang melibatkan enzim ini menjadi mahal. Amobilisasi enzim dapat mengatasi masalah ini, yang memungkinkan penggunaan enzim berulang kali. Dalam penelitian ini, protease dari *Bacillus* sp. BT 1, yang diperoleh dari sumber air panas, diamobilisasi dengan jebakan menggunakan poliakrilamida. Ekstrak kasar dalam bentuk enzim protease bebas dan enzim amobil dikarakterisasi termasuk suhu optimum, pH optimum, waktu inkubasi dan stabilitas enzim amobil pada penggunaan berulang. Aktivitas protease diukur dengan menggunakan metode Kunitz yang modifikasi. Hasil penelitian menunjukkan waktu produksi optimum protease adalah 36 jam yang berada pada akhir fase eksponensial pertumbuhan bakteri. Amobilisasi ekstrak kasar protease *Bacillus* sp. BT 1 dapat menjebak 47,18% dari protease. Suhu optimum protease bebas 60 °C dan meningkat menjadi 70 °C pada penggunaan protease amobil. Protease bebas dan protease amobil memiliki pH optimum yang sama yaitu 11. Protease amobil tidak kehilangan aktivitas secara signifikan sampai empat kali penggunaan.

Kata kunci: **imobilisasi, protease, poliakrilamida**

PROTEASE IMMOBILIZATION FROM *Bacillus* sp. BT 1 USING POLYACRYLAMIDE

ABSTRACT

The use of proteases in general, in the free enzyme form that only disposable, so the cost of production that involve this enzyme forms to be expensive. Enzyme immobilization can overcome this problem, which allows the use of the enzyme repeatedly. in this study, protease from *Bacillus* sp. BT 1, which is obtained from a hot spring, was immobilized by entrapment using polyacrylamide. crude extract in the form of protease-free enzyme and immobilized enzyme was characterized include the optimum temperature, optimum pH, incubation time and stability of the immobilized enzyme with repeated usage. Protease activity was measured using a modified Kunitz method. The results showed optimum protease production time was 36 hours which was at the end of exponential phase bacterial growth. Immobilization of crude extract protease from *Bacillus* sp. BT 1 can trap 47.18% of the protease. The optimum temperature of free protease was 60 °C and increased to 70 °C on the use of immobilized proteases. Protease free and

immobilized proteases have the same optimum pH of 11. Immobilized protease did not lose its activity significantly until four times usage.

Keywords: **Immobilized, Protease, Polyacrylamide**

PENDAHULUAN

Salah satu alasan pemanfaatan enzim di berbagai proses industri adalah karena sifat enzim yang memiliki efisiensi tinggi, spesifik, dan kerja yang selektif serta reaksi tanpa menghasilkan produk samping. Enzim yang banyak digunakan salah satunya adalah protease. Penggunaan enzim protease dalam berbagai bidang industri antara lain dalam pengolahan pangan, penyamakan kulit, deterjen, dan pengolahan limbah cair (Moon dan Parulekur, 1993).

Produksi enzim memerlukan biaya yang cukup tinggi, padahal penggunaan enzim hanya terbatas sekali pakai saja, sehingga setiap mulai pengolahan atau analisis lagi harus menggunakan enzim baru karena enzim yang telah dipakai di dalam larutan sulit untuk dipisahkan dan dipergunakan lagi. Menurut Soehartono (1989) dan Winarno (1995), selama enzim belum mengalami kerusakan struktur, enzim masih dapat dipakai secara berulang-ulang. Kekurangan-kekurangan tersebut dapat diatasi dengan teknologi enzim yaitu membuat enzim amobil (*Immobilized enzyme*).

Amobilisasi enzim dapat dilakukan dengan beberapa metode, salah satu metode yang sering digunakan adalah metode penjebakan enzim dalam kisi semipermeabel menggunakan poliakrilamida. Enzim amobil dengan bahan pendukung poliakrilamida relatif lebih stabil dibandingkan bahan pendukung lain seperti Ca-alginat dan Kapa-karagenan. Poliakrilamida sebagai media pendukung akan menjebak enzim dalam keadaan bebas dan tidak terikat pada bahan pendukung sehingga secara

relatif fungsi katalitik dan struktur alami molekul enzim tidak mengalami perubahan sehingga enzim tetap dapat berfungsi. Berdasarkan hal tersebut, maka tujuan penelitian ini adalah melakukan amobilisasi terhadap protease dari *Bacillus* sp. BT 1 menggunakan poliakrilamida dengan harapan dapat meningkatkan efisiensi pemakaiannya terutama di bidang industri.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Biokimia. Bahan yang digunakan: isolat bakteri *Bacillus* sp. BT 1 koleksi Laboratorium Biokimia yang diisolasi dari sumber air panas Pancuran Pitu Baturraden, medium NB (*Nutrient Broth*), medium NA (*Nutrient Agar*), medium SMA (*Skim Milk Agar*), *Trichloro Acetic Acid* (TCA), substrat kasein, pereaksi dan larutan standar Lowry, standar tirosin, bis-akrilamid, TEMED (tetrametiletildiamin), ammonium peroksodisulfat, alkohol 70%, dan akuades. Medium inokulum dan medium produksi (Glukosa monohidrat 5,5 g; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,3 g; pepton 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; dan akuades 1000 mL)

Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pembuatan inokulum

Inokulum dibuat dengan cara memindahkan bakteri *Bacillus* sp. BT 1 dari medium pertumbuhan menggunakan

jarum ose secara aseptis ke dalam 20 mL medium untuk inokulum dan diinkubasi dengan *shaker incubator* selama 1 x 24 jam pada suhu 40 °C dan pH 8.

2. Penentuan waktu produksi optimum ekstrak kasar protease dan kurva pertumbuhan bakteri

Inokulum sebanyak 10% dimasukkan ke dalam 1000 mL medium produksi dan diinkubasi suhu 40 °C. Pengukuran waktu produksi optimum enzim protease dan kurva pertumbuhan isolat bakteri *Bacillus* sp. BT 1 dilakukan pada jam ke 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48. Waktu produksi optimum enzim dapat diketahui dengan mengukur aktivitas ekstrak kasar enzim protease menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi. Kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp. BT 1 dibuat dengan mengukur tingkat kekeruhan (*optical density*) medium produksi menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 600 nm. Waktu produksi optimum yang diperoleh merupakan parameter untuk memproduksi enzim protease.

3. Produksi protease

Produksi protease dilakukan dengan cara memindahkan 10 mL biakan bakteri *Bacillus* sp. BT 1 dari medium inokulum ke dalam 100 mL medium produksi. Medium produksi selanjutnya diinkubasi dengan *shaker incubator* selama waktu produksi optimum pada suhu 40 °C.

4. Ekstraksi protease

Bakteri hasil biakan pada medium produksi dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C, sehingga diperoleh endapan dan supernatan. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar protease ekstraseluler. Sebagian ekstrak kasar protease selanjutnya diamobilisasi

menggunakan poliakrilamida untuk selanjutnya dilakukan karakterisasi meliputi suhu dan pH optimum.

5. Amobilisasi enzim (Alexander dan Griffiths, 1993)

Enzim yang tidak diamobilisasi disebut enzim bebas. Amobilisasi enzim dilakukan menggunakan metode penjebakan dengan bahan pendukung poliakrilamida. Ekstrak kasar protease sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam cawan petri kecil, ditambahkan 4 mL bis-akrilamid, 2 mL TEMED (0,23 µl/100 mL), dan 0,05 gr ammonium peroksodisulfat. Dilakukan pengadukan selama penambahan campuran dengan cara menggoyangkan cawan secara perlahan. Reaksi polimerisasi dibiarkan terjadi pada suhu dingin dan tertutup, tidak terkena udara maupun cahaya (sekitar 10 menit). Gel poliakrilamida yang terbentuk dipotong kecil-kecil (3x2x2 mm), kemudian dicuci dengan buffer yang sama dua kali untuk menghilangkan enzim yang tidak terjerap. Enzim amobil dan buffer pencucinya dilakukan uji aktivitas dan kadar protein untuk mengetahui efektivitas amobilisasi. Enzim yang telah diamobilisasi disebut enzim amobil. Enzim amobil juga dilakukan karakterisasi untuk mengetahui suhu dan pH optimum.

6. Uji Aktivitas protease

Aktivitas proteolitik protease diukur menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi. Sebanyak 2 mL substrat kasein (0,1 b/v) dalam buffer yang disesuaikan diprainskubasi pada suhu 40 °C selama 5 menit. Reaksi enzim dimulai dengan menambahkan 0,2 mL larutan enzim untuk enzim bebas dan 0,5 gr untuk enzim amobil ke dalam substrat dan diinkubasi pada suhu 40 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 mL larutan TCA dalam keadaan dingin. Campuran uji

dibiarkan mengendap selama 30 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, 4 °C selama 15 menit. Peptida terlarut dalam supernatan hasil hidrólisis diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm. Larutan kontrol dibuat dengan cara yang sama, tetapi larutan TCA ditambahkan terlebih dahulu, dilanjutkan dengan penambahan larutan enzim. Fuad, dkk. (2004) menyatakan bahwa satu unit aktivitas protease (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan μg tirosin/menit mL enzim larutan enzim dari substrat kasein pada kondisi pengujian tersebut.

7. Penentuan kadar protein

Penetapan kadar protein enzim dilakukan dengan metode Lowry. Larutan standar protein (BSA) dengan konsentrasi 100-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam buffer Tris-HCl pH 8 disiapkan dan masing-masing sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda dan larutan enzim, kemudian ditambah dengan pereaksi C. Setiap tabung reaksi dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 ml pereaksi E dan dikocok. Larutan dibiarkan selama 30 menit. Warna yang terbentuk diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm.

8. Karakterisasi ekstrak kasar enzim protease bebas dan enzim amobil

Penetapan suhu optimum enzim

Prosedur kerja penetapan suhu optimum enzim sama seperti pada uji aktivitas, tetapi dengan variasi suhu mulai 40-75 °C untuk enzim bebas dan 50-80 °C untuk enzim amobil pada pH 8.

Penetapan pH optimum enzim

Prosedur kerja penetapan pH optimum enzim sama seperti pada penetapan suhu optimum, tetapi dengan

variasi pH. Variasi pH yang dilakukan adalah 8-12 masing-masing untuk enzim bebas dan enzim amobil. Buffer yang digunakan untuk pH 8 dan 9 adalah buffer Tris-HCl, untuk pH 10 dan 11 digunakan buffer NaHCO_3 dalam NaOH, sedangkan untuk pH 12 digunakan buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Penetapan waktu inkubasi enzim amobil

Prosedur kerja penetapan waktu inkubasi sama seperti uji aktivitas, uji dilakukan pada suhu dan pH optimum dengan variasi waktu inkubasi yaitu 30, 60, 90, dan 120 menit.

Penentuan stabilitas enzim amobil

Enzim amobil diselidiki tingkat kestabilan aktivitasnya terhadap pemakaian berulang. Enzim amobil dilakukan uji aktivitas pada suhu optimum, pH optimum, dan waktu inkubasi dari enzim amobil. Pemakaian berulang dilakukan sampai terlihat penurunan aktivitas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan waktu produksi optimum ekstrak kasar protease dan kurva pertumbuhan bakteri

Waktu produksi optimum diperoleh ketika enzim protease yang dihasilkan mencapai aktivitas maksimum. Waktu produksi optimum enzim dapat diketahui dengan mengukur aktivitas ekstrak kasar enzim protease menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi. Metode Kunitz didasarkan atas kemampuan enzim untuk menguraikan substrat kasein menjadi peptida asam amino dalam hal ini tirosin dan mengukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm (Fuad dkk., 2004). Kurva penentuan waktu produksi optimum dan pertumbuhan bakteri

Bacillus sp. BT 1 dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus* sp. BT 1 terus meningkat setelah diinkubasi selama 30 jam dan mencapai optimum pada waktu inkubasi 36 jam dengan nilai aktivitas sebesar 0,3886 U/mL dan terjadi pada fase eksponensial (log). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kusumadi (1998) mengenai mikroorganisme penghasil enzim protease pada suhu tinggi yang diisolasi dari Gunung Tangkuban Perahu dan daerah Dieng diperoleh waktu inkubasi optimum adalah 36 jam.

Amobilisasi enzim protease

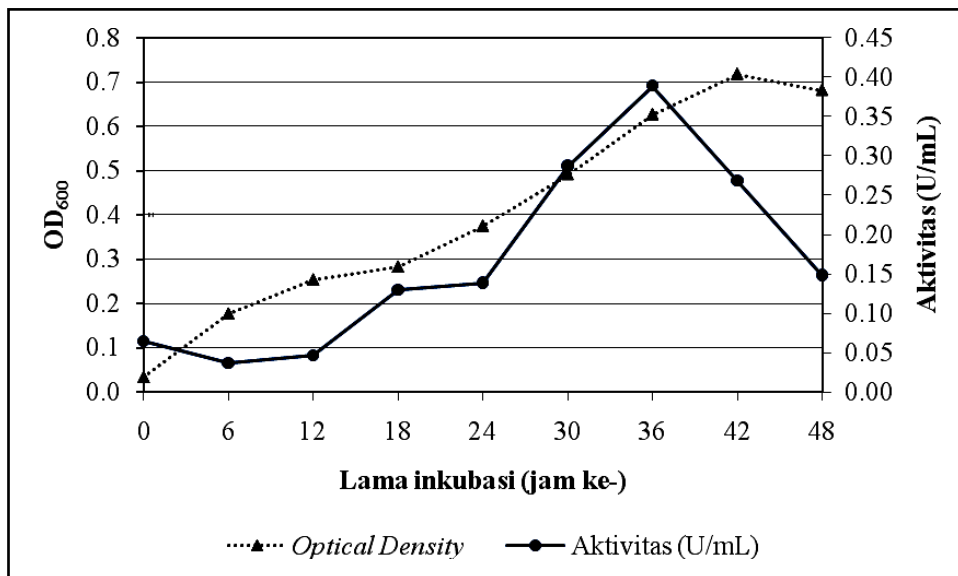
Enzim yang telah dijebak dengan poliakrilamida dipotong kecil-kecil dan

dicuci dengan buffer, enzim amobil dan buffer pencucinya dilakukan uji aktivitas dan kadar protein untuk mengetahui efektivitas amobilisasi (Tabel 1). Enzim yang terjebak dalam poliakrilamida adalah sebesar 47,18%, sedangkan aktivitas ekstrak kasar (EK) amobil adalah sebesar 0,722 U/mL.

Karakterisasi Enzim Protease Bebas dan Amobil

Penentuan suhu optimum

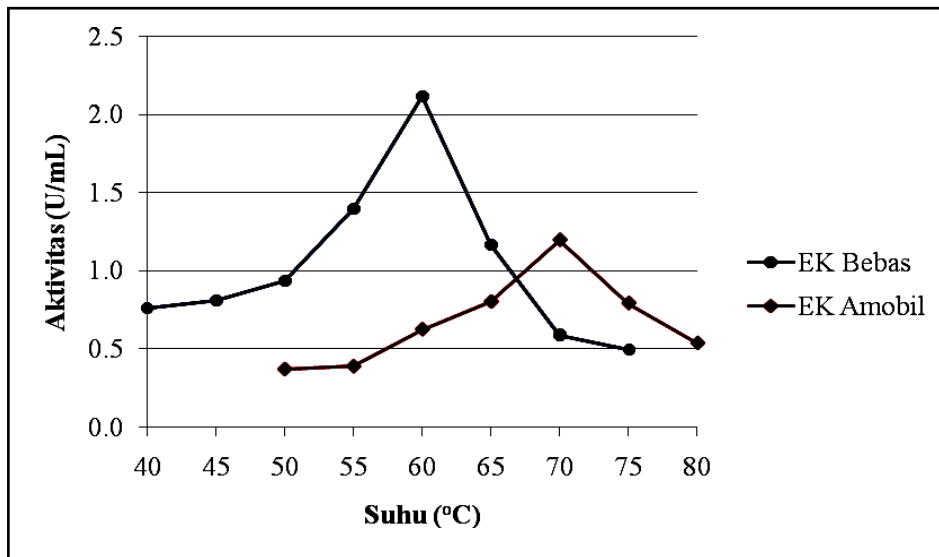
Penentuan suhu optimum EK bebas dan amobil dari *Bacillus* sp. BT 1 dilakukan dengan menginkubasi enzim pada berbagai variasi suhu. Aktivitas EK bebas dan amobil dapat dilihat pada Gambar 2.



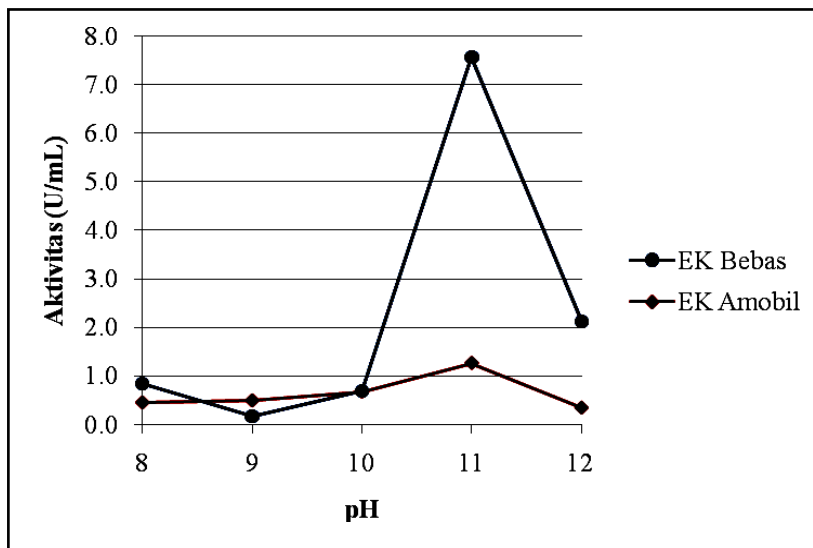
Gambar 1. Aktivitas protease dan kekeruhan (OD) dari *Bacillus* sp. BT 1

Tabel 1. Data efektivitas amobilisasi

Fraksi	Kadar Protein (µg/mL)	% Kadar Protein	Aktivitas (U/mL)
EK Bebas	836,038	100	1,862
Buffer EK Amobil	441,604	52,82	0,999
EK Amobil	394,434	47,18	0,722



Gambar 2. Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas EK bebas dan amobil dari *Bacillus* sp. BT 1



Gambar 3. Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas enzim protease bebas dan amobil dari *Bacillus* sp. BT 1

Berdasarkan Gambar 2 tampak bahwa mula-mula aktivitas enzim masih rendah dan terus meningkat seiring pertambahan suhu hingga mencapai suhu optimum. Suhu optimum EK bebas dari *Bacillus* sp. BT 1 adalah 60 °C dan suhu optimum EK amobilnya adalah 70 °C.

Menurut Sadikin (2002), suhu yang sangat rendah menyebabkan kerja enzim terhenti secara reversibel, karena

tidak terjadi benturan antara Enzim (E) dan Substrat (S) sehingga tidak terbentuk kompleks Enzim-Substrat (ES) dan menyebabkan tidak terbentuknya Produk (P). Suhu apabila dinaikkan perlahan maka benturan antara E dan S untuk membentuk kompleks ES semakin besar sehingga P yang dihasilkan semakin banyak hingga suhu optimum tercapai. Peningkatan suhu diatas suhu optimum

menyebabkan perubahan konformasi struktur molekul protein sehingga enzim kehilangan sifat alamiahnya atau terdenaturasi, akibatnya aktivitas enzim mengalami penurunan.

Suhu optimum pada enzim amobil lebih besar dibandingkan enzim bebas, hal ini dikarenakan adanya tambahan energi yang dibutuhkan agar substrat dapat menembus halangan ruang yang disebabkan bahan penyangga. Menurut Soehartono (1989), proses amobilisasi meningkatkan daya tahan enzim terhadap suhu, karena pemakaian bahan penyangga dalam amobilisasi enzim akan melindungi enzim terhadap pengaruh denaturasi panas.

Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas EK bebas dan amobil pada berbagai variasi pH substrat kasein dan dilakukan pada suhu optimum. Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas EK bebas dan amobil dari *Bacillus sp.* BT 1 dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3 tampak bahwa EK bebas dan EK amobil dari *Bacillus sp.* BT 1 mempunyai pH optimum 11. Enzim berada pada struktur tiga dimensi yang tepat saat kondisi pH optimum, sehingga enzim dapat mengikat dan mengolah substrat dengan kecepatan tertinggi.

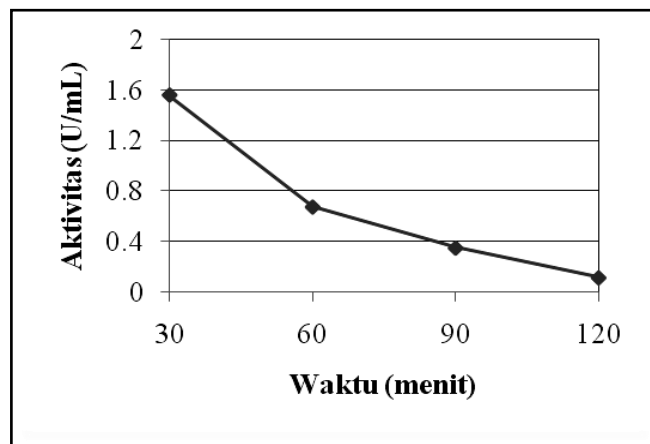
Struktur tiga dimensi enzim mulai berubah pada kondisi di luar pH

optimum, sehingga substrat tidak lagi berada pada posisi yang tepat pada bagian molekul enzim. Hal ini menyebabkan proses katalisis tidak berjalan optimum, sehingga aktivitas enzim berkurang (Sadikin, 2002). Aktivitas suatu enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ion hidrogen (keasaman dan kebasaan). Hal ini disebabkan residu asam amino yang terdapat pada pusat aktif enzim harus berada dalam keadaan ionisasi yang tepat agar menjadi aktif.

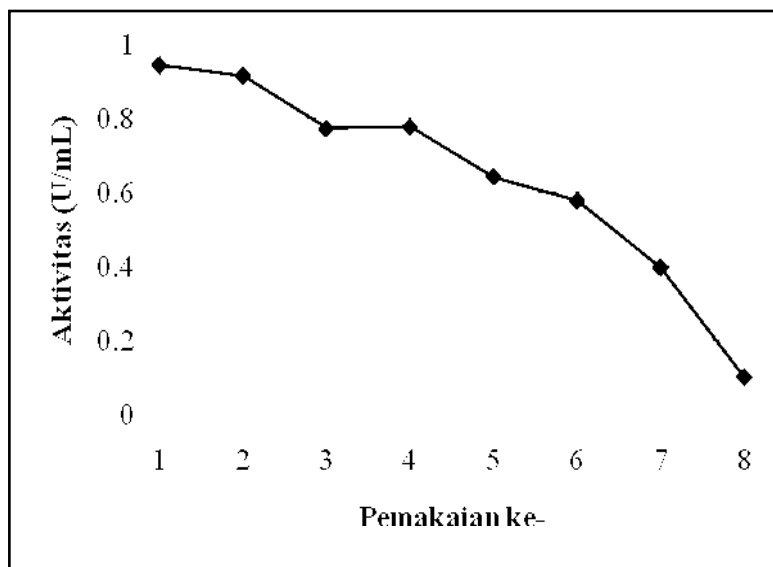
Penentuan waktu inkubasi enzim amobil

Penentuan waktu inkubasi bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi pada menit berapa enzim dapat bekerja maksimum menghasilkan produk tinggi. Kurva penentuan waktu inkubasi EK amobil dapat dilihat pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan aktivitas EK amobil optimum pada waktu inkubasi 30 menit. aktivitas EK amobil semakin menurun sampai waktu inkubasi 120 menit hingga tersisa 7%. Waktu inkubasi yang terlalu lama membuat aktivitas enzim semakin menurun, hal ini dikarenakan enzim mengalami perubahan konformasi struktur molekul atau terdenaturasi, sehingga tidak terbentuk kompleks Enzim-Substrat dan menyebabkan tidak terbentuknya produk akibatnya aktivitas enzim mengalami penurunan.



Gambar 4. Penentuan waktu inkubasi EK amobil dari *Bacillus* sp. BT 1



Gambar 5. Stabilitas EK amobil terhadap pemakaian berulang dari *Bacillus* sp. BT 1

Uji pemakaian berulang enzim amobil.

Uji pemakaian berulang EK amobil bertujuan untuk mengetahui stabilitas EK amobil terhadap pemakaian berulang. EK amobil diuji aktivitasnya pada suhu optimum, pH optimum dan waktu inkubasi. Penentuan stabilitas enzim terhadap uji pemakaian berulang dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan Gambar 5 tampak bahwa aktivitas EK amobil stabil pada pemakaian ke-1 hingga ke-4. Aktivitas EK amobil selanjutnya mengalami penurunan secara drastis. Hal ini menunjukkan bahwa amobilisasi enzim protease dengan poliakrilamida

meningkatkan kestabilan untuk empat kali pemakaian berulang.

Proses amobilisasi menyebabkan penurunan aktivitas enzim namun meningkatkan stabilitas enzim. Penghambatan reaksi enzimatik oleh pengaturan difusi dari pemindahan substrat dan produk merupakan salah satu kelemahan metode penjerapan enzim dalam gel. Pada enzim yang telah diamobilisasi, substrat dan produk dengan berat molekul tinggi sering sulit melewati pori-pori gel. Substrat yang mempunyai berat molekul tinggi akan sulit masuk ke dalam gel, begitu juga apabila produk yang dihasilkan

mempunyai berat molekul tinggi akan sulit keluar dari gel, sehingga aktivitasnya menjadi berkurang (Smith, 1990). Menurut Soehartono (1989), penurunan aktivitas enzim amobil kemungkinan disebabkan oleh matriks penyangga yang digunakan bersifat *porous*, sehingga enzim mudah keluar dari gel.

Pengujian stabilitas enzim terhadap pemakaian berulang dilakukan oleh Hendri dan Aspita (2008). Enzim α -amilase yang diamobilisasi dengan polimer kitin stabil terhadap pemakaian berulang setelah pemakaian ke-6 dan mengalami penurunan aktivitas sebesar 88,56%. Najafi, *et al.*, (2005) melakukan amobilisasi enzim protease yang diisolasi dari *Pseudomonas aeruginosa* PD100 dan uji pemakaian berulang stabil hingga pemakaian ke-6.

KESIMPULAN

Suhu optimum EK bebas adalah 60 °C dan meningkat menjadi 70 °C pada penggunaan EK amobil. EK bebas dan EK amobil memiliki pH optimum yang sama yaitu 11. Amobilisasi ekstrak kasar protease dengan poliakrilamida meningkatkan kestabilan untuk empat kali pemakaian berulang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas bantuan dana penelitian melalui Program Hibah Bersaing.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, R.R. dan J. M Griffiths, 1993, *Basic Biochemical Methods*. Wiley-Liss, Inc.
- Fuad, A. M., Rini, dan R. M. Nisa, 2004, *Produksi dan Karakterisasi Parsial*

Protease Alkali Termotabil Bacillus thermoglucosidarius AF-01, *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, Vol.9, No.1, 29-35.

- Hendri, J dan Aspita L., 2008, *Studi Pemanfaatan Polimer Kitin sebagai Media Pendukung Amobilisasi Enzim α -Amilase, Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II 2*, Universitas Lampung, Lampung.
- Kusumadi, G., 1998, *Isolasi dan Pemilahan Mikroorganisme Penghasil Enzim Protease pada Suhu Tinggi*, *Skripsi* (tidak dipublikasikan), IPB, Bogor.
- Moon, S. H. and S. J. Parulekur., 1993, *Some Observation on Protease Producing in Continuous Suspension Cultures of Bacillus Firmus*, *Biotech. Bioengineering*, Vol.41, 43-54.
- Najafi, M. F., Dileep D., and Deepti D., 2005, *Potential Applications of Protease from Pseudomonas aeruginosa PD100*, *Chile Journal of Biotechnology*, Vol.8, No.2.
- Sadikin, M., 2002, *Biokimia Enzim*, Penerbit Widya Medika, Jakarta.
- Smith, J. E., 1990, *Prinsip Bioteknologi*, PT Gramedia, Jakarta.
- Soehartono, M. T., 1989, *Bioteknologi Enzim*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi antar Universitas, Jakarta.
- Winarno, F. G., 1995, *Enzim Pangan*, Gramedia, Jakarta