

# KEMAMPUAN *BACILLUS LICHENIFORMIS* DALAM MEMPRODUKSI ENZIM PROTEASE YANG BERSIFAT ALKALIN DAN TERMOFILIK

Yati Sudaryati Soeka, \* Sri Hartin Rahayu, \* Ninu Setianingrum, \* Elidar Naiola \*

## *THE ABILITY OF BACILLUS LICHENIFORMIS IN PRODUCTION OF PROTEASE ENZYME ALKALINE AND THERMOPHILIC*

### *Abstract*

*The aim of the research was to measure the production of protease enzyme in alkaline and thermophilic of bacteria Bacillus licheniformis. The protease enzyme signed by clear zone around the bacteria colonies on medium which contain 1% skimmed milk. The activities of protease enzyme treated by the period of incubation, temperature and pH, which measured by spectrophotometer at A 280 nm. The results showed that the highest production of protease activity at 2 days incubation was 150,52 U/mL. At temperature 50°C and pH 10 they were 123,34 U/mL and 193,14 U/mL.*

*Key words: protease enzyme, clear zone, spectrophotometer*

### **Pendahuluan**

Dewasa ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya tekanan dari para ahli dan pecinta lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri.<sup>1</sup>

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh. Enzim pemecah protein atau protease sangat penting dalam proses pencernaan untuk memecah ikatan peptida dari protein yang dikonsumsi menjadi asam-asam amino yang mudah diabsorpsi. Di dalam dunia medis enzim protease digunakan sebagai terapi untuk pengobatan tumor, radang, kelainan darah dan pengaturan kekebalan. Selain

itu, karena protein diperlukan untuk membawa kalsium yang terikat pada protein dalam darah, kekurangan protease dapat menyebabkan artritis, osteoporosis dan penyakit-penyakit lain yang berkaitan dengan kekurangan kalsium. Karena kalsium diubah menjadi glukosa, kekurangan protein yang dicerna tubuh akan menyebabkan kemurungan, ketidak-stabilan suasana hati (*mood*) dan mudah tersinggung. Protease juga mampu mencerna serpihan-serpihan yang tidak diinginkan dalam darah termasuk bakteri dan virus. Oleh karena itu, orang yang kekurangan protease kekebalannya akan menurun sehingga ia lebih rentan terhadap infeksi bakteri, virus dan jamur.<sup>1</sup> Selain itu, protease juga memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film, dan limbah.<sup>1</sup>

\* Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi- LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911

---

---

Bakteri dari Genus *Bacillus* memainkan peranan utama dalam perkembangan industri. Karena mempunyai sifat yang mudah dipelihara dan dikembangbiakkan juga mempunyai karakter yang beraneka ragam yaitu psikrofilik, mesofilik, termofilik di samping itu alkalofilik, neutrofilik dan asidofilik. *Bacillus licheniformis* menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler yaitu, α-amilase, amino peptidase, protease metal, α-laktamase, endo-N-asetilglukoaminidase dan lipase.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri *B. licheniformis* yang dapat menghasilkan enzim protease yang bersifat alkalin dan termofilik.

## Bahan dan Cara Kerja

### Bahan

- a. Isolat sampel  
*B. licheniformis* ditumbuhkan di dalam media Nutrient Agar (NA) miring.
- b. Media seleksi enzim  
1% susu skim, 0,1% pepton, 2% agar.
- c. Media kultur bakteri  
1% susu skim, 0,1% pepton di dalam bufer glisin-NaOH pH 8,0
- d. Uji aktivitas  
0,1% azokasein dalam larutan buffer glycin-NaOH 0,05 M pH 8, 10% asam trikloroasetat (TCA)
- e. Karakterisasi pH  
Substrat azokasein dengan variasi konsentrasi bufer glisin-NaOH 0,05 M pH 7,5; 8; 8,5; 9,0; 10,0; 11,0.

### Cara Kerja

- a. Isolat sampel  
*B. Licheniformis* di dalam media NA diinkubasi pada suhu kamar sampai berumur 3 hari.
- b. Media seleksi  
Media seleksi dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah dingin satu ujung ose *B. licheniformis* ditumbuhkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari.
- c. Produksi inokulum.  
Satu ujung ose *B. licheniformis* dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi air steril,

dikocok dengan vorteks. Suspensi bakteri diukur kerapatan optiknya (OD) dengan spektrofotometer pada A 600 nm sampai OD mencapai 0,5.

### d. Media produksi enzim

Produksi protease dilakukan dengan menginokulasikan 2,5 mL inokulum ke dalam 25 mL media kultur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-6 hari di atas pengocok (shaker) inkubator dengan kecepatan 120 rpm. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 3 mL dan dipisahkan filtrat dan endapannya dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 10.160 x g selama 5 menit. Filtrat digunakan sebagai larutan enzim dan diuji aktivitas proteasenya. <sup>5</sup>

## Uji Aktivitas Protease

### a. Uji Kadar Asam Amino

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim direaksikan dengan 0,2 mL substrat 0,1% azokasein dalam larutan buffer glycin-NaOH 0,05 M dengan pH 8 dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 20 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,6 mL 10% asam trikloroasetat (TCA). Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit dan filtrat dipisahkan dari endapan. Pembacaan Optical density (OD) terhadap tirosin yang dibebaskan dalam filtrat dilakukan dengan spektrofotometer pada A 280 nm. Cara kerja yang sama dilakukan untuk larutan standar tirosin dan blanko berupa air suling. Pada blanko, enzim ditambahkan setelah direaksikan dengan TCA. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 µg tirosin dalam kondisi pengukuran tersebut. <sup>6</sup>

Aktivitas protease diuji dengan mengukur kadar asam amino sebagai produk hidrolisis protein dari susu skim oleh enzim protease. Larutan enzim yang menghasilkan asam amino yang terlalu tinggi diencerkan terlebih dahulu dan faktor pengenceran digunakan dalam perhitungan aktivitasnya.

### b. Karakterisasi suhu, pH dan stabilitasnya

Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan variasi pH substrat azokasein 7,5-11 dan variasi suhu 30-70°C. Untuk uji stabilitas enzim terhadap pH dan suhu, sampel diinkubasi

pada pH dan suhu masing-masing selama 10 menit.. Selanjutnya dianalisis seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.

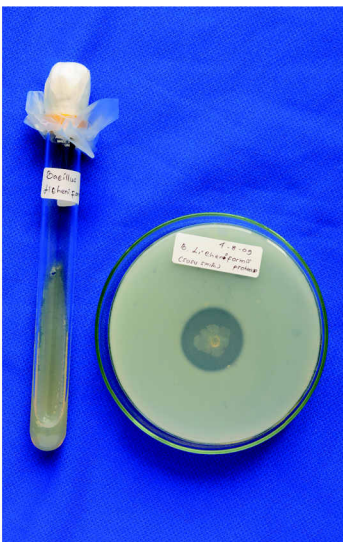
### Hasil

Pada Gambar 1 dapat dilihat aktivitas kualitatif protease dari *B. licheniformis* pada media seleksi agar yang mengandung substrat susu skim diperlihatkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

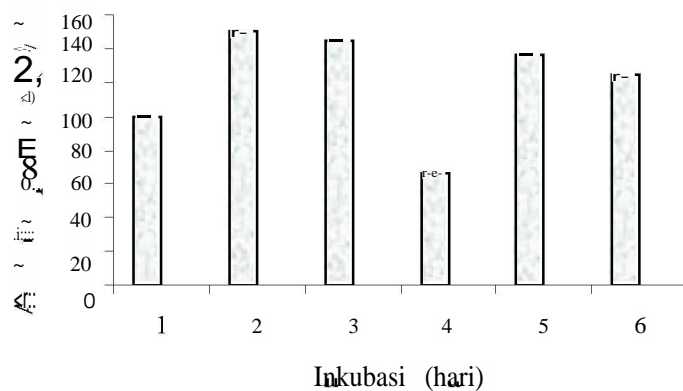
Pada Gambar 2 dapat dilihat aktivitas *B. licheniformis* dengan waktu inkubasi 1-6 hari.

Aktivitasnya dari 66,79-150,52 U/mL, pada hari ke 2 didapat aktivitas protease tertinggi sebesar 150,52 U/mL.. Pada hari ke 3-6 terjadi penurunan aktivitas, terutama pada hari ke 4 walaupun pada hari ke 5 terjadi kenaikan lagi.

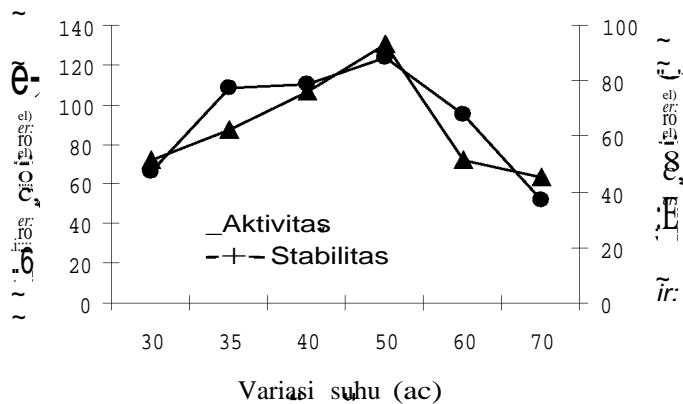
Pada Gambar 3 dapat dilihat pengaruh suhu terhadap aktivitas protease. Aktivitas variasi dari 51,73- 123,35 U/mL.. Pada suhu inkubasi 30°C sampai dengan 50°C terjadi kenaikan aktivitas, tetapi pada suhu 60°C dan 70°C terjadi penurunan aktivitas. Pada suhu 50°C didapat aktivitas protease tertinggi sebesar 123,34 U/mL dengan stabilitasnya sebesar 93,14 U/mL..



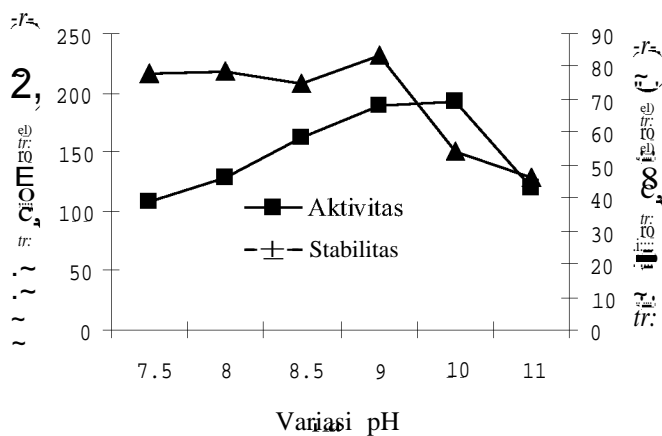
Gambar 1. Zona Bening di sekitar Koloni *B. licheniformis*



Gambar 2. Aktivitas Protease Bakteri *B. licheniformis* dalam Waktu Inkubasi 1-6 hari



**Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas protease**



**Gambar 4. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Protease dan Stabilitas**

Pada Gambar 4 dapat dilihat pengaruh pH terhadap aktivitas protease, pada inkubasi 2 hari dan suhu inkubasi 50°C didapat aktivitas berkisar antara 98,3- 193,14 U/mL.. Sedangkan untuk stabilitas enzim dengan waktu inkubasi 10 menit berkisar 54,31- 83,11 U/mL.. Aktivitas tertinggi didapat pada pH 10 sebesar 193,14 U/mL, terjadi penurunan aktivitas setelah enzimnya diinkubasi didalam larutan bufer selama 10 menit sebesar 71,88 %.

### Pembahasan

Hasil pengujian secara kualitatif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni

mikroba. Hasil pengujian secara kualitatif adalah dengan adanya lingkaran bening di sekitar koloni dan pengujian secara semikualitatif adalah hasil bagi diameter lingkaran jernih dengan diameter koloni dan dinyatakan sebagai aktivitas protease secara relatif.<sup>7</sup>

Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium yang mengandung azo kasein, karena azo kasein merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease dan menginduksi sintesis enzim protease alkalin.<sup>8,9</sup>

---

Produksi protease dipengaruhi oleh waktu, suhu, pH inkubasi. Dengan waktu inkubasi 2 hari didapat aktivitas protease tertinggi. Hasil penelitian dengan waktu inkubasi optimum selama 48 jam pada suhu 60°C dan pH 11.<sup>10</sup> Dilihat dari kisaran suhu pertumbuhan, *B.licheniformis* ini dapat digolongkan sebagai bakteri termofil. Bakteri termofil berkisar antara 45-65°C.<sup>11</sup> Aktivitas enzim juga akan meningkat dengan meningkatnya suhu sampai mencapai suhu optimumnya, tetapi setelah melewati suhu optimumnya aktivitas enzim akan menurun."-- Kondisi fermentasi merupakan faktor penting untuk menghasilkan enzim. *Bacillus* sp. yang ditumbuhkan pada lingkungan alkali menghasilkan enzim proteolitik yang alkali lebih tinggi dibandingkan bila bakteri tersebut ditumbuhkan pada lingkungan netral.<sup>13</sup> Protease dari *B.licheniformis* mempunyai pH optimum untuk aktivitasnya antara 8 sampai 9. Stabil pada selang pH yang luas dan dapat diinaktifkan dengan cepat pada pH di bawah 5 dan di atas 11.<sup>8</sup> *B. licheniformis* KA-08 sangat potensi menghasilkan enzim termostabil. *B. licheniformis* merupakan mikroorganisme yang sangat potensial digunakan sebagai sumber enzim, karena bersifat termofilik yang dapat hidup pada suhu tinggi 50-65 °C.<sup>14</sup> Untuk *B. licheniformis* N-2 menghasilkan maksimum proteolitik sebesar 123,29 PU/ml optimumnya pada suhu 60°C dan pH 11.<sup>10</sup> Berdasarkan suhu pertumbuhannya mikroba digolongkan menjadi lima kelompok yaitu psikrofil tumbuh pada suhu -5-20°C, mesofil suhu 20-45°C, termofil 45-65°C, termofil ekstrim 65-85°C dan hipertermofil 85-100°C. Menurunnya aktivitas mengikuti meningkatnya suhu di atas optimum biasanya disebabkan oleh kerusakan enzim."-- Kecepatan reaksi kimia akan meningkat dengan meningkatnya suhu karena akan mempercepat gerak termal molekul dan karenanya akan meningkatkan bagian molekul yang memiliki energi dalam jumlah yang cukup untuk memasuki keadaan transisi. Stabilitas enzim protease ditunjukkan dengan tidak terjadinya penurunan aktivitas setelah enzim diinkubasi selama 10 menit.<sup>16</sup> Pada suhu 70-80°C enzim akan mengalami kerusakan yang mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim. Batasan ini tidak mutlak, karena ada enzim tertentu yang tahan terhadap pemanasan pada suhu tinggi yaitu enzim termostabil dan ada juga enzim yang optimum pada suhu rendah. Enzim-enzim termostabil mempunyai karakteristik biokimiawi yang menarik. Sifat termostabilitas enzim berkaitan

dengan bagian asam-asam amino yang bersifat hidrofobik, intensitas interaksi elektrostatis dan jembatan disulfida di antara asam amino penyusun struktur protein.<sup>12</sup>

Aplikasi enzim pada beberapa industri menghendaki enzim-enzim yang dalam beraktivitas tahan terhadap panas (termostabil). Hal ini berkaitan dengan keuntungan yang akan diperoleh bila proses produksi dilakukan pada suhu tinggi dapat menurunkan resiko kontaminasi, meningkatkan kecepatan reaksi sehingga menghemat waktu, tenaga dan biaya, serta menurunkan viskositas larutan fermentasi sehingga memudahkan proses produksi."-- Dalam industri fermentasi protease alkalin merupakan jenis protease yang paling banyak diaplikasikan dalam bidang industri.<sup>1</sup> Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, penggalian mikroorganisme penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia. Keragaman hayati yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim protease.

Aktivitas tertinggi enzim protease dari *Bacillus licheniformis* pada penelitian ini pada pH 10 dan pada suhu 50°C dapat digolongkan sebagai enzim yang mempunyai kemampuan bertahan pada lingkungan alkalin (tahan terhadap basa) dan termofil (tahan terhadap suhu tinggi) sehingga dapat digunakan untuk biodeterjen. Enzim alkalin dan termofil merupakan unsur penting dalam biodeterjen, Protease memiliki pH optimum antara 9 dan 10, apabila ditambahkan ke dalam biodeterjen dapat menghilangkan kotoran dari protein.<sup>18</sup> *B. licheniformis* adalah bakteri berbentuk batang gram-positif. Banyak digunakan untuk keperluan industri seperti produksi enzim, antibiotik dan metabolit kecil. Suhu pertumbuhan optimalnya adalah 50°C, tetapi dapat juga bertahan pada suhu yang lebih tinggi. Suhu optimal untuk sekresi enzim adalah 37°C. Bakteri ini dapat bertahan hidup di lingkungan yang keras dengan mengubahnya berbentuk spora tetapi apabila kondisi baik, ia akan kembali ke dalam keadaan vegetatif.<sup>19</sup>

*B. licheniformis* adalah mikroorganisme tanah membentuk spora yang memberikan kontribusi untuk siklus nutrisi dan memiliki

aktivitas anti jamur. Ada penelitian terkini tentang *B. licheniformis* (strain SB3086) dan efek sebagai fungisida mikroba. Novozymes Biofungicide Green Releaf berisi *B. licheniformis* strain SB3086 sebagai bahan utama aktif fungisida. Dapat digunakan pada lapangan rumput, tumbuhan runjung, bibit pohon, rumput hias dan tanaman hias di luar ruangan, rumah kaca, dan situs pembibitan."-- Laju reaksi enzim meningkat pada pH alkalin kemudian berkurang setelah pada pH maksimum telah tercapai. Dapat dibandingkan dengan isolat *Bacillus macerans* PL3 dalam media dedak sebesar  $113,52 \cdot 10^{-2} U/mU$  sedangkan setelah pemurnian isolat *Bacillus* sp. menghasilkan aktivitas spesifiknya 43,02 *U/mg* (kromatografi penukar ion DEAE Sephadex A 50), 21 isolat *Aktinomisetes* BYL-15 dan BYL-28 yang menunjukkan aktivitas enzim tertinggi, masing-masing 106,450 *U/mL* dan 100,00 *U/mL* filtrat biakan 1, dan dari isolat *Bacillus* sp. DA 5.2.3 dan L5 masing-masing 2,0 *U/mL* dan 1,4 *U/mL*.<sup>22</sup>

### Kesimpulan

Kemampuan produksi enzim protease dari bakteri *Bacillus licheniformis* memiliki kemampuan, dimana dengan waktu 2 hari inkubasi memiliki aktivitas tertinggi sebesar 150,52 *U/mL*, pada pH 10 sebesar 193,14 *U/mL* dan pada suhu 50°C sebesar 123,34 *U/mL*.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada DIKTI-LIPI 2009 yang telah mendanai penelitian ini.

### Daftar Pustaka

1. Akhdiya A. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil Buletin Plasma Nutfah, 2003, 9 (2): 38-44.
2. Ahira A Protease adalah pemecah protein. [www.aneahira.com/enzim-adalah](http://www.aneahira.com/enzim-adalah) .• diakses 4 Mei 2011.
3. Moon, S.H. and S.J. Parulekar. Same observation on protease producing in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. Biotech. Bioeng, 1993,41 :43-54.
4. Priest, EG. Extracellular Enzymes Sintesis in the Genus *Bacillus*. Bacteriological Rev. , 1977,41(3).
5. Cappuccino J.G., and N. Sherman. Mikrobiology : A Laboratory Manual.. Addison- Wesley Publishing Company. California USA, 1983.
6. Yang S.S., C.I. Huang. Proteases production by amyolytic fungi in solid state fermentation. *Journal Chinese Agri Chem Soc.*, 1994,32(6): 589-601. .
7. Naiola, E., N. Widhyastuti. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Jurnal Berita Biologi*, 2002, 6(3): 467- 473.
8. Ward, O.P. Proteinase. Di dalam W.M. Fogarty (ed). Microbial and Enzyme Biotechnology. Applied Science Publisher, New York, 1983.
9. Fujiwara, N. and Yamamoto, K. Di dalam Akhdiya A Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil Buletin Plasma Nutfah, 2003, 9 (2): 38-44.
10. Nadeem, M., J.I. Qazi, S. Baig, Q. Syed. Studies on Commercially Important Alkline Protease from *Bacillus licheniformis* N-2 Isolated from Decaying Organic Soil. *Turk Journal Biochemistry*, 2007, 32(4): 171-177.
11. Rudiger, A, A Sunna, and G. Antranikian. Enzymes from Extreme Thermophilic and Hyperthermophilic Archea and Bacteria. Di dalam: Carbohydrases, Handbook of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. VCH Verlagsgesellschaft, . Weinhem, 1994.
12. Suhartono, M.T. Di dalam Rahayu, S. Karakteristik Biokimiawi Enzim Termotabil Penghidrolisis Kitin. Makalah Pengantar Falsafah Sains (PPS 702). Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, 2004.
13. Glazer, AN. and H. Nikaida. Di dalam AgustienAdan Y.Rilda. Produksi Keratinase Termotabil dari *Bacillus licheniformis* KA-08 Amobil dan Aplikasinya Untuk Bahan Penyamak Kulit.. Artikel Hibah Bersaing, 2009. *repository.un and.ac.id I...IARTIKEL-HIBER \_ANTHONI \_A GUSTIN-2009* diakses 11 Agustus 2011.
14. AgustierA, danY..Rilda. Produksi Keratinase Termotabil dari *Bacillus licheniformis* KA-08 Amobil dan Aplikasinya Untuk Bahan Penyamak Kulit.. Artikel Hibah Bersaing,

- 
2009. *repository.unand.ac.id/...IARTIKEL-HIBER\_ANTHONI\_A GUSTIN-2009* diakses 11 Agustus 2011.
15. VolkWA&MF.Wheeler. Mikrobiologi Dasar. Jilid 1. Soenartono Adisoemarto Editor. Penerbit Erlangga Jakarta. Terjemahan dari: Basic Microbiology, fifth edition, 1988.
  16. Palmer, T. Extraction and purification of enzymes. **In** Understanding Enzymes. Ellis Horwood Ltd. England, 1991.
  17. Rahayu, S. Karakteristik Biokimiawi Enzim Termostabil Penghidrolisis Kitin. Makalah Pengantar Falsafah Sains (PPS 702). Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, 2004.
  18. Snoke, John E. (University of California, Los Angeles), and Neal Cornell.. Protoplast lysis and inhibition of growth of *Bacillus licheniformis* by bacitracin. *J Bacteriol.* 1965, 89:415-240., *jombangan.com/tautan/bacillus-licheniformis*. Diakses 10 Mei 2011.
  19. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A, Gottschalk, G. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential.. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2004,7(4):204-211.*jombangan.com/tautan/bacillus-licheniformis* diakses 10 Mei 2011.
  20. Wikipedia. *Bacillus\_licheniformis* [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/brad\\_006492.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_006492.pdf), diakses 10 Mei 2011.
  21. Naiola, E., N. Widhyastuti. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati*, 2007, 13(1): 51-56.
  22. Jamilah I, A Meryandini, I. Rusmana, ASuwanto, N.R. Mubarik.. Activity of Proteolytic and Amylolytic Enzymes from *Bacillus* spp. Isolated from Shrimp Ponds. *Microbiology Indonesia*, 2009, 3(2): 67-71..