

UJI AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DARI ISOLAT *Bacillus* sp. GALUR LOKAL RIAU

Rani Yuniati, Titania T. Nugroho, Fifi Puspita

Mahasiswa Program Studi S1 Kimia
Bidang Biokimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia
raniyuniati@gmail.com

ABSTRACT

Proteolytic bacteria are bacteria that are able to hydrolyze proteins into smaller peptides or completely into amino acid units. This study was carried out to determine the proteolytic activity of *Bacillus* sp. B1 isolated from rhizosphere of mustard plants. The proteolytic activity of the enzymes were determined based on the amount of tyrosin liberated in Unit/mL, while the specific activity of the enzymes were indicated by activity per unit weight of proteins. The protein concentration of enzyme extracts were determined by the Lowry method. The activity of enzyme was determined at various production times (6, 12, 18, 24, 30, and 36 hours). The results showed that the *Bacillus* sp. B1 isolate was able to produce protease. *Bacillus* sp. B1 isolate obtained its maximum activity in 30 hours of production time. The specific activity of protease *Bacillus* sp. B1 was $0,2523 \pm 0,0050$ Unit/mg proteins.

Keywords : *Bacillus* sp., protease, protein, proteolytic bacteria,

ABSTRAK

Bakteri proteolitik merupakan bakteri yang dapat menghidrolisis protein menjadi peptida-peptida yang lebih kecil atau unit asam amino. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas proteolitik dari isolat *Bacillus* sp. B1 yang diisolasi dari rizosfer tanaman sawi. Aktivitas enzim protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dilepaskan dalam satuan Unit/mL, sedangkan aktivitas spesifik enzim ditentukan berdasarkan jumlah aktivitas per mg protein dalam ekstrak kasar. Konsentrasi protein ditentukan dengan metode Lowry. Aktivitas enzim diamati pada berbagai rentang waktu produksi (6, 12, 18, 24, 30, dan 36 jam). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. B1 mampu menghasilkan enzim protease. Isolat *Bacillus* sp. B1 menunjukkan aktivitas optimumnya pada waktu produksi 30 jam. Aktivitas spesifik dari enzim protease *Bacillus* sp. B1 adalah $0,2523 \pm 0,0050$ Unit/mg protein.

Kata kunci : *Bacillus* sp., bakteri proteolitik, protease, protein.

PENDAHULUAN

Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Protease tidak hanya berperan dalam proses metabolisme seluler, namun juga dapat diaplikasikan dalam bidang industri. Enzim ini merupakan salah satu enzim skala industri dengan tingkat penjualan hingga 60% dari total penjualan enzim di dunia. Aplikasi enzim protease di antaranya pada industri pembuatan detergen, industri penyamakan kulit, bahan aditif pada industri pangan, dan zat terapeutik pada bidang farmasi (Gupta dkk., 2002; Rao dkk., 1998).

Protease dapat dihasilkan oleh tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease terbatas oleh tersedianya lahan tanam dan kondisi pertumbuhan yang sesuai, serta memerlukan waktu produksi enzim yang lama. Produksi protease dari hewan juga dibatasi oleh ketersediaan ternak penghasil enzim. Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling potensial dibandingkan tanaman dan hewan. Penggunaan mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik. Beberapa genus bakteri yang diketahui mampu menghasilkan protease di antaranya *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, dan *Pseudomonas* (Rao dkk., 1998; Said dan Likadja, 2012).

Spesies *Bacillus* sp. merupakan salah satu mikroba penghasil enzim protease yang potensial. Beberapa enzim

protease komersial berhasil dimurnikan, misalnya Alcalase (*B. licheniformis*), Esperase (*B. lentus*), Biofeed pro (*B. licheniformis*) dan Subtilisin (*B. alcalophilus*) (Gupta dkk., 2002). Tari dkk. (2005) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. L21 dapat menghasilkan enzim protease yang bersifat tahan basa. Sementara itu, Suganthi dkk. (2013) melaporkan bahwa *Bacillus licheniformis* dapat menghasilkan enzim protease yang bersifat halotoleran. Pada penelitian ini, isolat *Bacillus* sp. juga digunakan sebagai penghasil enzim protease. Isolat yang digunakan adalah isolat *Bacillus* sp. B1 yang merupakan koleksi laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Riau.

Produksi enzim protease dipengaruhi oleh faktor waktu produksi enzim. Waktu produksi yang sesuai akan menghasilkan aktivitas enzim maksimum. Suganthi dkk. (2013) melaporkan bahwa spesies *Bacillus licheniformis* menghasilkan aktivitas enzim maksimum pada waktu produksi 24 jam. Produksi enzim pada penelitian ini menggunakan variasi waktu produksi antara 6 hingga 36 jam dengan interval 6 jam. Waktu produksi yang sesuai diharapkan mampu memaksimalkan aktivitas enzim protease yang diperoleh.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Spektrofotometer genesis 10 S UV-Vis, Autoklaf ALL American model 1925 X/KY-23D Wisconsin Aluminium Foundry Co. inc. Manitowoc, pH meter 210 A orion, Waterbath thermostat WK-24 (Shibata Scientific Technologamy Ltd.), Vortex mixer Genie 2TM Cat. No.

12-82, Tabung mikro dan alat-alat standar lainnya yang digunakan di laboratorium sesuai dengan prosedur kerja.

Bahan-bahan yang digunakan susu skim (Greenfields, S000010052), pepton (Merck, 1072280500), NaCl, agar batang, kasein (Merck, 750344), standar tirosin (Merck, 1.083710025), Na₂CO₃ (Merck, 6392.1000), kertas saring *GF/C Whatman* (Cat. No. 1822055), *Corning syringe filters* 0,45 µm selulosa asetat bebas surfaktan (Cat. No. CLS431220-50EA), standar protein untuk penentuan konsentrasi protein adalah *albumin bovine serum fraction V* (ex. Hopkin & Williams, Cat. No. 114255), reagen Folin-Ciocalteu (Merck, 1.09001.0500), dan bahan kimia lain adalah proanalisis atau bahan preparatif sesuai prosedur kerja.

b. Uji kualitatif aktivitas proteolitik

Isolat *Bacillus* sp. B1 diremajakan pada media *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam pada 37°C. Uji kualitatif aktivitas enzim protease dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat *Bacillus* sp. B1 pada media *Skim Milk Agar* (SMA). Media SMA mengandung pepton (0,1% w/v), NaCl (0,5% w/v), agar (2,0% w/v) dan susu skim (10% v/v) (Chu, 2006). Uji positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri pada permukaan media SMA.

c. Produksi dan optimasi waktu produksi enzim protease

Inokulum disiapkan dengan cara menambahkan satu ose isolat pada 50 mL NB dan diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Inokulum kemudian diinokulasikan pada

media produksi Horikoshi sedemikian rupa hingga OD akhir total dalam media produksi menjadi 0,13/mL. Media Horikoshi mengandung 1% glukosa, 0,5% *yeast extract*, 0,5% pepton, 0,1% KH₂PO₄, 0,02% MgSO₄, dan 1% Na₂CO₃. Na₂CO₃ steril ditambahkan pada media setelah proses sterilisasi (Tari dkk., 2005). Inkubasi dilakukan dalam *shaker incubator* dengan kecepatan agitasi 150 rpm pada suhu 37°C dengan variasi waktu produksi 6, 12, 18, 24, 30, dan 36 jam.

d. Isolasi ekstrak kasar enzim

Enzim protease yang terdapat dalam media produksi dipisahkan dari sel isolatnya dengan cara sentrifugasi dalam keadaan dingin dengan kecepatan 9500 rpm selama 10 menit. Sebelum sentrifugasi, media kultur berisi enzim tersebut didinginkan pada suhu 10°C selama kurang lebih 1 jam. Supernatan disaring dengan *filter glass fiber* (Whatman GF/C) dan disterilisasi dengan *Corning sterile syringe filter* 0,45 µm. Jika enzim tidak langsung digunakan untuk analisis aktivitas enzim, kemudian ditambahkan NaN₃ hingga konsentrasi larutan 1 mM ke dalam setiap larutan supernatan.

e. Uji aktivitas enzim protease

Ekstrak kasar enzim yang telah diisolasi selanjutnya ditentukan aktivitas proteolitiknya berdasarkan Cupp dan Enyard (2008). Sebanyak 1 mL ekstrak kasar enzim ditambahkan pada substrat kasein 0,65% (0,65 gr kasein dalam 100 mL bufer K-Pospat 0,05 M pH 7,5). Campuran reaksi diinkubasi pada 37°C selama 10 menit. Terminasi reaksi dilakukan melalui penambahan 5 mL reagen TCA 110 mM, dan diinkubasi

kembali pada 37°C selama 30 menit. Sebanyak 2 mL filtrat dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 10000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL reagen Folin Ciocalteu ditambahkan ke dalam filtrat dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Absorbansi campuran diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk melepaskan 1µmol tirosin pada substrat kasein per menit.

f. Penentuan kadar protein

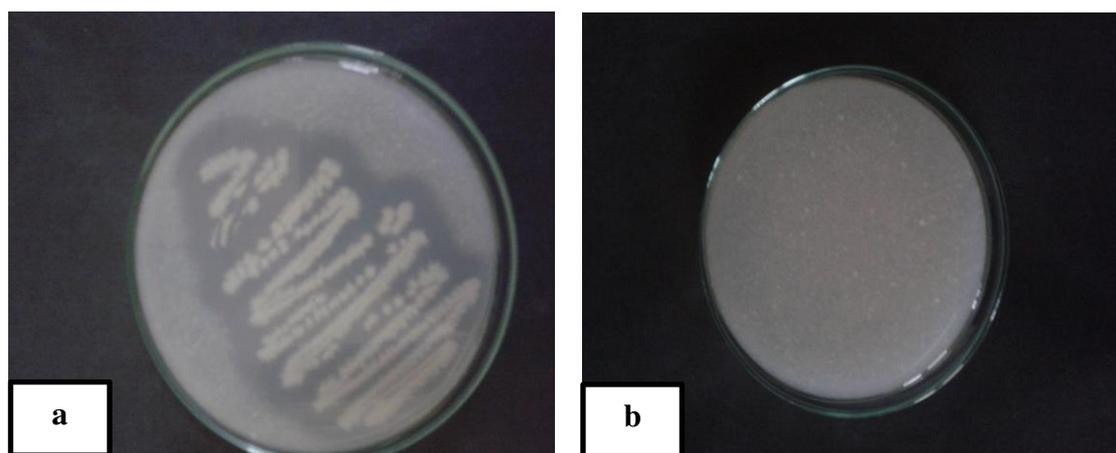
Kadar protein dalam ekstrak kasar enzim ditentukan menggunakan metode Lowry dengan *bovine serum albumin* sebagai standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas proteolitik dilakukan pada isolat *Bacillus* sp. B1 dengan menggunakan media SMA. Uji positif

ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media SMA. Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. B1 merupakan bakteri proteolitik karena mampu menghasilkan enzim protease yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri. Isolat *Bacillus* sp. B1 yang terbukti memiliki aktivitas proteolitik kemudian dijadikan sebagai starter pada proses produksi enzim protease.

Aktivitas proteolitik isolat *Bacillus* sp. B1 pada media SMA ditunjukkan pada Gambar 1. Protein yang terdapat pada media selektif SMA bertindak sebagai inducer bagi enzim protease. Zona bening yang dihasilkan merupakan hasil hidrolisis substrat protein yang terkandung dalam media SMA oleh enzim protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Media SMA mengandung pepton dan susu skim sebagai sumber karbon utama bagi kebutuhan metabolisme bakteri.



Gambar 1. Hasil uji kualitatif aktivitas proteolitik isolat bakteri *Bacillus* sp. B1 (a) dan kontrol (b) pada media SMA.

Tabel 1. Nilai aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. B1 dengan berbagai variasi waktu produksi.

Waktu Produksi (Jam)	Aktivitas Rata-rata Enzim Protease ($\times 10^{-3}$ Unit/mL)*
6	$3,54385 \pm 0,0030^c$
12	$6,6609 \pm 0,0010^b$
18	$7,7394 \pm 0,005^b$
24	$8,8813 \pm 0,0054^b$
30	$19,9194 \pm 0,0015^a$
36	$10,9113 \pm 0,0011^b$

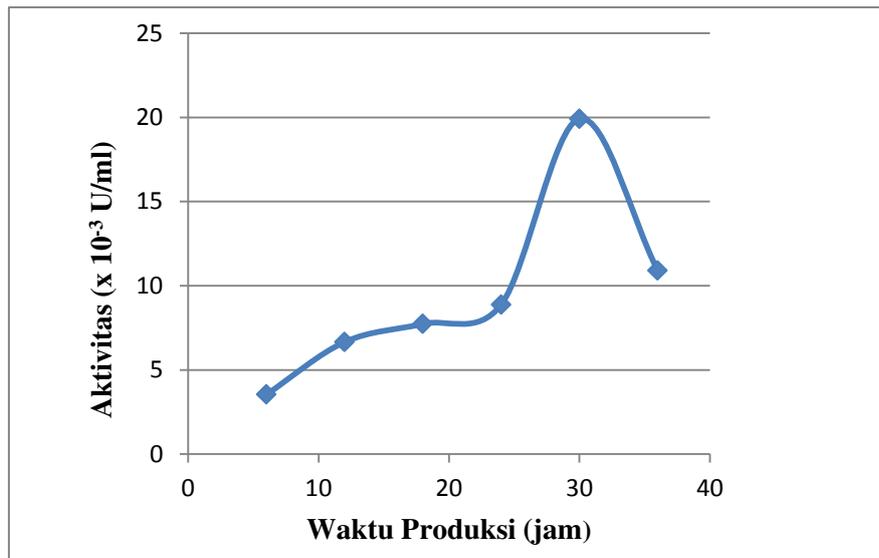
Catatan: *) Rata-rata nilai aktivitas enzim dari tiga kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ($\alpha \leq 0,05$) pada kolom yang sama berdasarkan uji Duncan jarak berganda.

Penentuan waktu produksi optimal dilakukan pada waktu produksi 6, 12, 18, 24, 30, dan 36 jam oleh isolat *Bacillus* sp. B1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. B1 menunjukkan waktu produksi optimal pada 30 jam dengan aktivitas $19,9194 \times 10^{-3}$ Unit/mL (Tabel 1.). Selain aktif menghasilkan enzim protease, isolat *Bacillus* sp. B1 juga mampu menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas maksimum berturut-turut adalah $7,130 \times 10^{-3}$ U/mL (Rahayu, 2014).

Pada Gambar 2. menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. B1 mengalami kenaikan aktivitas dari 6 jam inkubasi pertama hingga mencapai waktu produksi optimalnya yaitu 30 jam. Setelah mencapai waktu produksi optimalnya, isolat *Bacillus* sp. B1 mengalami penurunan aktivitas enzim. Kenaikan aktivitas enzim pada awal waktu produksi diduga disebabkan oleh masih tersedianya nutrisi dalam jumlah besar yang diperlukan sel bakteri untuk melakukan metabolisme sel. Pada akhir waktu produksi enzim, terjadi penurunan aktivitas proteolitik yang dapat terjadi karena berkurangnya jumlah substrat

yang akan menghambat pembentukan kompleks enzim substrat dan perubahan struktur enzim yang akan menyebabkan penurunan laju katalitik. Akibat perubahan struktur enzim, sisi aktif enzim mengalami perubahan bentuk sehingga tidak dapat digunakan secara baik dalam mengikat substrat (Yunita, 2012). Kemungkinan lain adalah kebutuhan bakteri akan nutrisi asam amino sudah terpenuhi, atau sel-sel bakteri mulai mengalami lisis yang dilanjutkan dengan fase kematian.

Nilai aktivitas enzim yang diperoleh pada penelitian ini masih jauh lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. Ve1 yang memiliki aktivitas protease maksimum sebesar 397 U/mL pada media gelatin cair (Patel dkk., 2004). Sementara itu, Nilegaonkar dkk. (2006) melaporkan bahwa enzim protease *Bacillus cereus* MCM B-326 yang diisolasi dari kulit kerbau memiliki aktivitas maksimum sebesar 126,87 U/mL pada media pati kedelai. Sumber perolehan galur *Bacillus* yang diisolasi Nilegaonkar dkk. (2006) berasal dari kulit kerbau, yang memiliki kandungan protein tinggi dan perlu didegradasi



Gambar 2. Grafik hubungan waktu produksi terhadap aktivitas enzim protease *Bacillus* sp. B1 pada suhu 37°C dan agitasi 150 rpm.

mikroba untuk keberlangsungan hidupnya. *Bacillus* sp. B1 yang diisolasi pada penelitian ini berasal dari tanah, yang konsentrasi proteinnya diduga jauh lebih rendah dari konsentrasi protein pada kulit kerbau. Kemungkinan tersebut menyebabkan aktivitas enzim protease pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Nilegaonkar dkk. (2006).

Aktivitas spesifik enzim protease diperoleh dengan cara membagi hasil aktivitas enzim protease dengan kadar proteinnya. Kadar protein enzim protease ditentukan dengan metode Lowry. Aktivitas spesifik enzim protease *Bacillus* sp. B1 yang diperoleh pada penelitian ini adalah $0,2523 \pm 0,0050$ Unit/mg protein. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik enzim, maka semakin tinggi pula tingkat kemurnian enzim tersebut. Hal ini disebabkan kahilangan protein non-enzim pada beberapa tahap pemisahan yang dilalui dalam pemurnian enzim (Wijaya, 2002). Aktivitas spesifik juga

mengindikasikan bahwa protein yang dihasilkan oleh mikroba ke media tumbuh merupakan protein target yang diinginkan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa isolat *Bacillus* sp. B1 merupakan bakteri proteolitik yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri pada media SMA. Isolat *Bacillus* sp. B1 memiliki waktu produksi optimal pada 30 jam dengan aktivitas enzim $(19,9194 \pm 0,0015) \times 10^{-3}$ Unit/mL dan aktivitas spesifik sebesar $0,2523 \pm 0,0050$ Unit/mg protein.

DAFTAR PUSTAKA

Chu, W.H. 2006. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **34**:241-245.

- Cupp, C., dan Enyard. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay – casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*. **19**:899.
- Gupta, R., Beg, Q.K., dan Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*. **59**:15-32.
- Nilegaonkar, S. S., Zambare, V. P., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K., dan Saranik, S. S. 2006. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*. **98** : 1238-1245.
- Patel, R., Dodia, M., dan Singh, S. P. 2004. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. *Process Biochemistry*. **40** : 3569-3575.
- Rahayu, A. G. 2014. Uji Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim Selulase dari Tiga Isolat *Bacillus* sp. Galur Lokal Riau. *Skripsi*. FMIPA, Universitas Riau, Pekanbaru.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., dan Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**:597-635.
- Said, M.I., dan Likadja, J.C. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi sebagai Penghasil Enzim Protease pada Industri Penyamakan Kulit Pt. Adhi Satria Abadi (Asa), Yogyakarta. *Makalah Ilmiah*. Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A., dan Gothandam, K.M. 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. **11**: 47-52
- Tari, C., Genckal, H., dan Tokatl, F. 2005. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. **41**:659-665.
- Wijaya, S. 2002. Isolasi kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar*. **3**: 30-35.
- Yunita, S. P. 2012. Skrining dan Uji Aktivitas Enzim Protease Bakteri dari Limbah Rumah Pemotongan Hewan. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Jakarta.