

KARAKTERISASI PROTEASE DARI ISOLAT BAKTERI ASAL TUMBUHAN RAWA DARI INDRALAYA

Characterization of Protease from Plant Bacteria In Indralaya Swamp

Ace Baehaki*, Rinto

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya

Diterima 7 Oktober 2011/Disetujui 27 Desember 2011

Abstract

Proteases constitute one of the most important groups of industrial enzymes, therefore screening of these proteases from bacteria is important. The aim of this study was to characterize proteases from plant swamp bacteria. The result of proteolytic assays revealed three isolates possessed proteolytic index >1.00 (T1P4, H1P4 and K1P4). The optimum fermentation time of each isolate was 48 hours. The optimum pH of proteases from T1P4, H1P4 and K1P4 was 8.0; 7.5; and 8.0, respectively. The optimum temperature of T1P4, H1P4 and K1P4 protease was 50 °C; 40 °C; and 50 °C, respectively. Metal ions (Fe, K, Mn, and Zn) inhibited T1P4 protease except Fe²⁺ (5 mM), H1P4 protease except Zn²⁺ (5 mM), K1P4 protease except Fe²⁺ (1 and 5 mM). Effect of inhibitor specific (EDTA) shown EDTA inhibit all proteases. Study on the effect of metals ion and spesific inhibitors indicated that all protease were metaloprotease. The moleculer weights of T1P4, H1P4 and K1P4 proteases were determinited by using SDS-PAGE and zymography technique were 151; 138; and 127 kD, respectively.

Key words: bacteria, characterization, protease, swamp

Abstrak

Enzim protease merupakan salah satu enzim industri yang penting, sehingga pencarian sumber bakteri penghasil protease penting dilakukan. Tujuan penelitian adalah melakukan karakterisasi protease bakteri yang diisolasi dari tumbuhan rawa. Hasil penapisan dengan uji proteolitik menunjukkan bahwa tiga isolat yaitu T1P4, H1P4 dan K1P4 memiliki indeks proteolitik yang lebih dari 1. Waktu produksi enzim protease yang optimum ketiga isolat tersebut adalah 48 jam. Enzim protease yang diisolasi dari T1P4 dan K1P4 mempunyai pH optimum 8,0 sedangkan yang berasal dari H1P4 mempunyai pH optimum 7,5. Suhu optimum protease protease asal isolat T1P4 dan K1P4 adalah 50 °C, untuk protease asal isolat H1P4 pada suhu 40 °C. Ion logam Fe, K, Mn, and Zn menghambat aktivitas protease dari semua isolat bakteri kecuali Fe²⁺ (5 mM) untuk protease T1P4, Zn²⁺ (5 mM) untuk protease H1P4 dan Fe²⁺ (1 dan 5 mM) untuk protease K1P4. EDTA menghambat semua protease isolat bakteri tumbuhan rawa. Hasil pengaruh ion logam dan inhibitor spesifik ini menunjukkan bahwa semua protease termasuk metaloprotease. Hasil estimasi berat molekul menggunakan SDS-PAGE dan zimogram menunjukkan protease T1P4 memiliki berat molekul sekitar 151 kD, protease H1P4 memiliki berat molekul sekitar 138 kD dan protease K1P4 memiliki berat molekul sekitar 127 kD.

Kata kunci : bakteri, karakterisasi, protease, rawa

PENDAHULUAN

Enzim protease [serine protease (EC. 3.4.21), cysteine (thiol) protease (EC 3.4.22), aspartic proteases(EC 3.4.23) dan metalloprotease (EC 3.4.24)] merupakan

salah satu group dari enzim industri yang penting, kira-kira 60% total pasar enzim adalah protease (Nunes dan Martins 2001; Singh et al. 2001). Diantara berbagai enzim protease, protease asal bakteri merupakan yang paling banyak digunakan, dibandingkan dengan protease hewan dan kapang (Ward 1985) dan diantara berbagai bakteri,

*Korespondensi: Jl. Palembang Prabumulih KM. 32 Indralaya, Ogan Ilir Sumatera Selatan, E-mail: ace76_none@yahoo.com

Bacillus sp. adalah produsen spesifik dari protease ekstraselular (Priest 1977). Enzim ini mempunyai aplikasi yang luas pada bidang industri, termasuk industri farmasi, industri barang dari kulit, pembuatan protein hidrolisat, industri makanan dan pada proses limbah industri (Pastor *et al.* 2001).

Sumber enzim dari mikroorganisme perlu digalakkan untuk memenuhi kebutuhan industri baik industri produk pertanian, kimia dan medis. Salah satu sumber enzim ini adalah mikroorganisme tumbuhan dari rawa Indralaya, Sumatera Selatan. Penelitian enzim dari mikroba rawa masih sedikit, Baehaki *et al.* (2011) berhasil mengisolasi bakteri dari tanah rawa yang menghasilkan enzim protease. Tujuan penelitian ini adalah melakukan karakterisasi protease dari isolat bakteri dari tumbuhan rawa Indralaya.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan utama adalah tiga isolat bakteri T1P4, H1P4 dan K1P4 yang memiliki indeks proteolitik yang tinggi dari hasil pemilihan tumbuhan rawa Indralaya, Sumatera Selatan.

Metode Penelitian

Isolasi Mikroba Rawa

Isolasi mikroba dilakukan dengan mengambil sampel bagian batang, daun dan akar tanaman rawa dari daerah Indralaya Sumatera Selatan secara aseptik. Batang, daun dan akar tanaman rawa diambil dan dilarutkan secara aseptik dalam larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) kemudian ditumbuk dengan mortal. Sebanyak 0,1 mL larutan tersebut ditumbuhkan dalam cawan petri dengan media *Luria Bertani Agar* (LBA) pada pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} . Isolat murni yang didapatkan diuji aktivitas proteolitik menggunakan media skim milk agar (SMA).

Uji Proteolitik

Uji proteolitik dilakukan menggunakan media skim milk agar (SMA) yaitu media LBA yang ditambah susu skim 2%. Isolat

ditusukkan dalam media SMA, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C selama 56 jam. Aktivitas proteolitik dari bakteri rawa yang ditumbuhkan pada media SMA ditunjukkan dengan terlihatnya areal bening yang muncul di sekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur diameter areal bening dan diameter koloni bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan diameter areal bening dengan diameter koloni bakteri.

Penentuan Waktu Optimum Produksi Protease

Bakteri diinokulasi sebanyak 1-2 ose pada media LB dengan komposisi tripton 1%, NaCl 1% dan *yeast extract* 0,5%. Proses diawali dengan penentuan umur prekulturan produksi protease (dalam media LB). Produksi protease dilakukan pada suhu 37 °C. Pengamatan dilakukan dengan mengukur *optical density* (OD) sampai nilai OD = 0,8 pada $\lambda = 620$ nm. Sebanyak 10% inokulum (dari jumlah media) dimasukkan ke dalam media LB yang baru sebagai media untuk memproduksi protease. Pengambilan sampel dilakukan setiap 8 jam selama 56 jam, kemudian diukur nilai OD-nya. Enzim protease diekstrak dengan cara sentrifugasi media pertumbuhan bakteri dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan merupakan ekstrak enzim yang akan diuji aktivitas protease dan kadar proteinnya.

Pengukuran Aktivitas Protease

Aktivitas protease diukur berdasarkan metode Bergmeyer *et al.* (1983) menggunakan substrat kasein Hammerstein 2% (b/v). Aktivitas protease diukur dengan mereaksikan 0,2 mL enzim dengan 1 mL substrat kasein Hammerstein dan 1 mL bufer. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,2 M asam trikloasetat (TCA). Larutan kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm 10 menit. Supernatan

hasil sentrifugasi ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Na_2CO_3 0,4 M, kemudian ditambah pereaksi folin Ciocalteau (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=578$ nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi optimum pengukuran.

Karakterisasi Protease

Uji karakterisasi protease meliputi pengaruh pH (6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9) dilakukan menggunakan buffer Tris-HCl 0,2 M; pH 8,0; pengaruh suhu (30; 40; 50; 60; 70°C); ion logam (NaCl , KCl , MnCl_2 , ZnCl_2 , dan FeCl_2) dan inhibitor spesifik (EDTA). Konsentrasi ion logam dan inhibitor spesifik yang digunakan masing-masing adalah 1 dan 5 mM.

Penentuan Berat Molekul

Penentuan berat molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (Laemmli 1970) dan zimogram (Choi *et al.* 2001). Pewarnaan pada metode SDS PAGE dilakukan dengan *silver staining*. Gel direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol dan 12% asam asetat) selama 1 jam, dilanjutkan dengan perendaman dalam 50% etanol selama 20 menit. Larutan tersebut diganti dengan 30% etanol selama 2 x 20 menit, kemudian diganti dengan *enhancer* dan dicuci dengan akuades. Gel yang telah dicuci ditambahkan larutan silver nitrat selama 30 menit, dicuci lagi dengan akuades 2 x 20 detik, ditambahkan larutan campuran Na_2CO_3 dan formaldehida dan terakhir dengan larutan fiksasi.

Prosedur zimogram adalah gel akrilamid 8% dikopolimerisasi dengan substrat kasein 2%, selanjutnya dilakukan elektroforesis. Gel selanjutnya direndam dengan Triton X-100 2,5% selama 1 jam dan diinkubasi dalam buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8 selama 24 jam. Gel yang telah diinkubasi diwarnai dengan pewarna Comassie Brilliant Blue R-250 hingga muncul zona bening.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Uji Proteolitik Bakteri

Penghasil Protease

Proses isolasi menghasilkan 12 isolat, yang kemudian diuji indeks proteolitiknya. Aktivitas proteolitik dari bakteri rawa yang ditumbuhkan pada media SMA terlihat dari adanya areal bening di sekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik isolat bakteri dari tanaman rawa Indralaya yang mempunyai nilai >1 dipilih untuk dianalisis aktivitas proteasenya (Tabel 1).

Penentuan Waktu Optimum Produksi

Protease

Protease diproduksi dari ketiga isolat, yaitu T1P4, H1P4, dan K1P4. Enzim tersebut diproduksi seiring dengan meningkatnya jumlah sel (OD), dan mencapai optimum pada waktu inkubasi 48 jam, menjelang fase stasioner. Diantara ketiga enzim tersebut, protease yang berasal dari isolat T1P4 mempunyai aktivitas paling tinggi yaitu 0,384 U/mL (Gambar 1).

Penelitian lain pada produksi protease bakteri didapatkan bakteri dengan waktu produksi protease optimum yang sama dengan protease isolat yang diperoleh dari penelitian (48 jam) adalah *Bacillus subtilis* PE-11 (Adinarayana *et al.* 2003) dan *Bacillus licheniformis* Lbbl-11 (Olajuyigbe dan Ajele 2008).

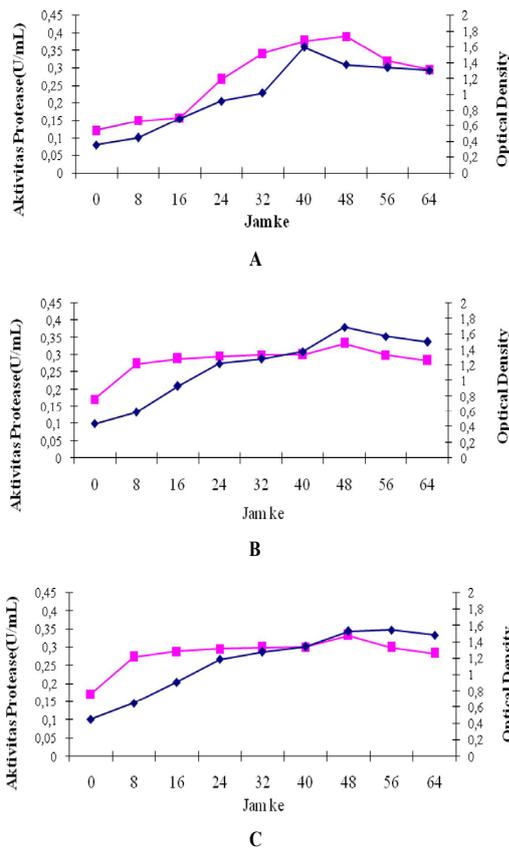
Karakteristik Ekstrak Kasar Protease

pH Optimum

Profil aktivitas pH dari suatu enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Protease isolat T1P4 dan

Tabel 1 Hasil uji proteolitik bakteri dari tanaman rawa

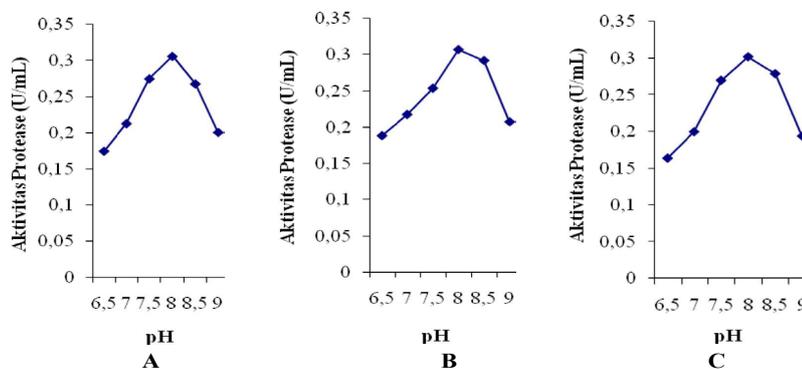
Isolat	Indeks proteolitik
T1P4	1,1
H1P4	1,2
K1P4	1,1



Gambar 1 Waktu produksi optimum protease dari isolat bakteri tanaman rawa, pengukuran *optical density* dilakukan pada panjang gelombang 620 nm (A= isolat T1P4, B= isolat H1P4 dan C= Isolat K1P4)

K1P4 memiliki pH optimum 8,0; sedangkan isolat H1P2 memiliki pH optimum pada pH 7,5. Pengaruh pH disajikan pada Gambar 2.

Isolat T1P4 dan K1P4 memiliki pH optimum pada pH 8,0 ini menunjukkan pada pH 8 gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik isolat ini



Gambar 2 Pengaruh pH pada protease dari bakteri tumbuhan rawa (A= isolat T1P4, B=H1P2 dan C=K1P4).

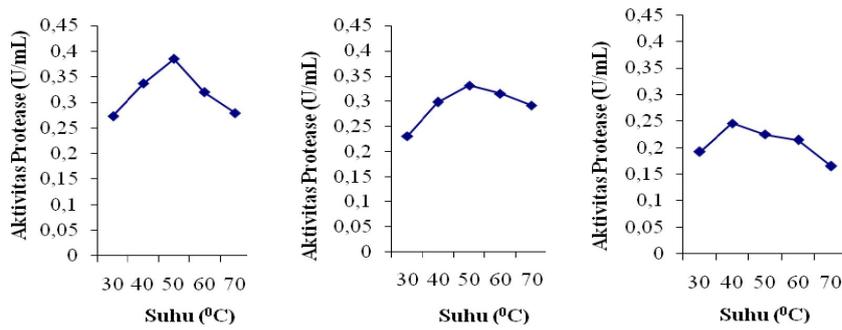
berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan sehingga pada pH tersebut aktivitas katalitiknya tertinggi. Isolat H1P2 memiliki pH optimum 7,5; pada pH ini gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik isolat ini berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan sehingga pada pH tersebut aktivitas katalitiknya tertinggi. Penelitian yang sama menunjukkan protease bakteri *P. aeruginosa* aktif pada pH 7-9 (Rao *et al.* 1998).

Suhu Optimum

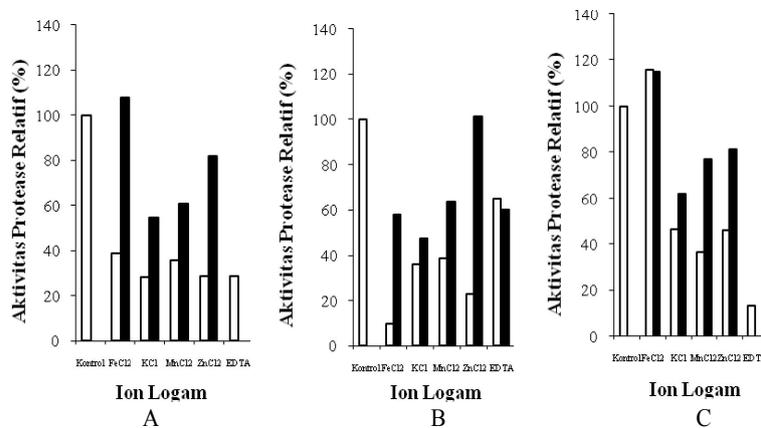
Hasil pengukuran aktivitas enzim pada berbagai suhu, menunjukkan bahwa protease asal bakteri isolat T1P4 dan K1P4 memiliki suhu optimum 50 °C, sedangkan isolat H1P4 memiliki suhu optimum 40 °C. Aktivitas protease pada berbagai suhu disajikan pada Gambar 3.

Aktivitas enzim menurun seiring peningkatan suhu setelah melewati suhu optimum. Hal ini dapat disebabkan oleh denaturasi protein enzim yang dapat mengubah konformasi struktur molekuler sehingga enzim kehilangan sifat alamiahnya. Aktivitas enzim rendah pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum, hal ini disebabkan rendahnya energi aktivasi yang tersedia. Energi tersebut dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik dari molekul enzim maupun dari molekul substrat.

Penelitian lain menunjukkan bahwa protease bakteri laut *Alteromonas* sp strain O7 memiliki suhu optimum 60 °C (Miyamoto



Gambar 3 Pengaruh suhu pada protease dari bakteri tumbuhan rawa (A= isolat T1P4, B=H1P2 dan C=K1P4).



Gambar 4 Pengaruh ion logam pada protease dari bakteri tumbuhan rawa. Konsentrasi ion logam 1 mM (□) dan konsentrasi 5 mM (■)(A= isolat T1P4, B=H1P2 dan C=K1P4).

et al. 2002) dan protease *Chromohalobacter* memiliki suhu optimum 75 °C (Vidyasagar et al. 2009). Suhu optimum kedua enzim tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan suhu optimum protease asal isolat bakteri tanaman rawa.

Pengaruh ion logam dan inhibitor spesifik

Pengaruh ion logam dan inhibitor spesifik (EDTA) terhadap aktivitas protease bakteri isolat tumbuhan rawa disajikan pada Gambar 4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ion K⁺ Mn²⁺ menghambat aktivitas protease semua isolat bakteri, sedangkan ion Fe²⁺ dan Zn²⁺ menghambat sebagian protease.

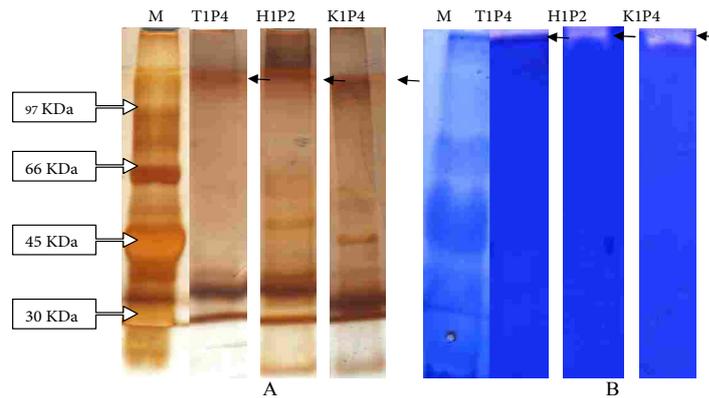
Inhibitor spesifik (EDTA) digunakan untuk menentukan penggolongan protease dan memperkuat adanya pengaruh logam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa EDTA (1 mM dan 5 mM) dapat menghambat

protease isolat bakteri tumbuhan rawa sehingga protease ini digolongkan sebagai metaloprotease (protease logam) (Gambar 4). Penelitian yang dilakukan Baehaki et al. (2008) menunjukkan bakteri *P. aeruginosa* dapat dihambat oleh EDTA dan PMSF sehingga digolongkan sebagai serin metaloprotease.

Penentuan berat molekul dengan SDS PAGE dan Zimogram

Penentuan berat molekul dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (Sodium Dodesil Sulfat-Poliakrilamide Gel Elektroforesis) dan zimogram merupakan metode yang sudah digunakan secara luas. Hasil SDS-PAGE dan zimogram protease isolat bakteri tanah rawa disajikan pada Gambar 5.

Hasil analisis SDS-PAGE pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat T1P4 memiliki 3 pita dengan berat molekul 33 kD



Gambar 5 Hasil SDS PAGE dan Zimogram protease isolat bakteri tumbuhan rawa (M=marker, A= SDS-PAGE, B=Zimogram).

sampai dengan 151 kD, protease isolat H1P2 didapatkan 7 pita dengan berat molekul 18 kD sampai 138 kD dan isolat K1P4 memiliki 6 pita dengan BM sekitar 19-127 kD. Hasil analisis zimogram menunjukkan protease asal isolat T1P4 memiliki berat molekul 151 kD, asal isolat H1P2 memiliki berat molekul 138 kD dan asal isolat K1P4 memiliki berat molekul sekitar 127 kD. Berat molekul metaloprotease dari bakteri *Alteromonas* sp. strain O-7 adalah 56 kD (Miyamoto *et al.* 2002) dan metaloprotease dari *Heliobacter pylori* memiliki berat molekul yang tinggi yaitu 200 kD (Windle dan Kelleher 1997).

KESIMPULAN

Enzim protease asal isolat dari tumbuhan rawa diproduksi secara optimum dengan waktu inkubasi 48 jam. Enzim tersebut memiliki karakteristik sebagai berikut: suhu optimum 50 °C (T1P4 dan K1P4) dan 40 °C (H1P4), pH optimum 8 (T1P4 dan K1P4) dan 7,5 (H1P4). Ion logam K^+ dan Mn^{2+} menghambat aktivitas semua protease asal isolat sedangkan Fe^{2+} dan Zn^{2+} menghambat sebagian protease. Enzim protease tersebut termasuk golongan metaloprotease.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing tahun 2008 dan 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K, Sllaiah P, Prasad DS. 2003. Production and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech* 4:E56-64.
- Baehaki A, Suhartono MT, Palupi NS, Nurhayati T. 2008. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 19(1):80-86.
- Baehaki A, Rinto, Budiman A. 2011. Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indralaya Sumatera Selatan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 22(1): 40-45.
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol 2. Weinheim: Verlag Chemie.
- Choi NS, Yoon KS, Lee JY, Han KY, Kim SH. 2001. Comparison of three substrates (casein, fibrin, and gelatin) in zimographic gel. *Journal of Biochemistry Molecular Biology* 34:531-536.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Miyamoto K, Tsujibo H, Nukui E, Itoh H, Kaidzu Y, Inamori Y. 2002. Isolation and characterization of the genes encoding two metalloproteases (MprI and MprII) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 66(2):416-21.

- Nunes AS, Martins MLL. 2001. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:271-275.
- Olajuyigbe FM, Ajele JO. 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* Lbbl-1 isolated from 'iru', a traditionally fermented African locust bean condiment. *Global Journal Biotechnology Biochemistry* 3 (1): 42-46.
- Pastor MD, Lorda GS, Balatti A. 2001. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 1-8.
- Priest FG. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriology Review* 41: 711-753.
- Rao MM, Tanksale AM, Gatge MS, Desphande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62(3):597-635.
- Singh J, Batra N, Sobti CR. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry* 36: 781-785.
- Vidyasagar M, Prokash S, Mahajan V, Shouche YS, Screermulu K. 2009. Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Brazilian Journal of Microbiology* 40(1):12-19
- Ward OP. 1985. Proteolytic enzymes. Di dalam: Moo-Young M, *et al*, editor. *Comprehensive Biotechnology* 3:789-818.
- Windle HJ, Kelleher D. 1997. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infect Immunology* 65(8): 3132-3137.