

SKRIPSI

ANALISIS ZIMOGRAM ENZIM PROTEASE *Bacillus pumilus* (y1)

Oleh
THERESIA WIDYASTUTI
F 28. 1583



1995
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
B O G O R**

Theresia Widya Astuti, F.28.1583. Analisis Zimogram Enzim Protease *Bacillus pumilus* (y1). Dibawah bimbingan : Maggy T. Suhartono dan Nuri Andarwulan.

RINGKASAN

Informasi tentang berat molekul enzim merupakan salah satu hal yang penting dalam karakterisasi enzim. Selama ini untuk memperoleh nilai berat molekul tersebut membutuhkan suatu metoda pemurnian enzim yang panjang, rumit, dan memerlukan ketelitian tinggi, namun dewasa ini telah berkembang teknologi yang lebih cepat dengan memanfaatkan reaksi spesifik antara enzim dengan substrat, yakni teknik zimogram. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah mencari metoda analisis zimogram yang dapat diandalkan untuk evaluasi berat molekul enzim protease yang dihasilkan oleh *B. pumilus* (y1) yang diisolasi dari limbah cair tahu.

Dalam penelitian ini dilakukan fermentasi bakteri untuk menghasilkan enzim protease dalam limbah cair tahu dengan penambahan 0.5% skim, kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi enzim menggunakan garam ammonium sulfat 55% (w/v). Endapan enzim yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dalam buffer fosfat 0.01 M pH 8.0 dengan volume minimum dan didialisis dalam kantung selofan yang dapat

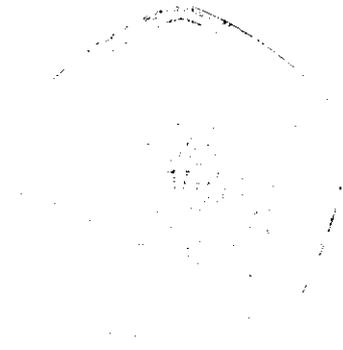


menahan molekul dengan berat molekul 12.000 Da atau lebih selama 1 malam. Dialisat yang diperoleh dilarutkan dalam pelarut sampel dan selanjutnya dielektroforesis dalam dua jenis gel poliakrilamid, yaitu SDS-PAGE (Sodium Dodesil Sulfat *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) dan non-SDS PAGE (non-Sodium Dodesil Sulfat *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dengan konsentrasi poliakrilamid 7.5%. Elektroforesis dilaksanakan pada suhu 4°C selama 5-8 jam dengan voltase 100 Volt pada satu jam pertama dan selanjutnya 200 Volt sampai elektroforesis selesai. Gel yang berisi pita protein tersebut diwarnai dengan metoda *Coomassie Blue* dan dilakukan teknik zimogram untuk mengetahui pita yang mengandung aktivitas protease. Teknik pembuatan zimogram yang digunakan adalah metoda *blotting* dengan 1.2% gel agarosa-substrat (0.75% kasein, gelatin, dan hemoglobin), metoda kopolimerisasi gel poliakrilamid-substrat kasein, dan metoda *blotting* film X-Ray. Hasil zimogram yang berupa pita bening akibat hidrolisis substrat oleh protease dibandingkan dengan hasil pewarnaan *Coomassie Blue*, sehingga dapat diduga berat molekul enzim protease.



Dari hasil pewarnaan *Coomassie Blue* pada gel non SDS diperkirakan terdapat 10 pita protein, masing-masing dengan berat molekul 20.200 Da, 29.000 Da, 59.600 Da, 82.600 Da, 149.600 Da, 196.300 Da, 271.600 Da, 355.600 Da, 465.600 Da, dan 518.800 Da.

Zimogram dengan metoda *blotting* pada gel agarosa-substrat pada gel non SDS memberikan hasil hidrolisis enzim yang dapat dideteksi pada substrat kasein, sedangkan pada substrat hemoglobin dan gelatin tidak memberikan hasil yang diharapkan. *Blotting* dengan gel agarosa yang mengandung kasein ini masih menunjukkan hasil reaksi yang cenderung menyebar, dan diduga berat molekul enzim protease adalah 32.000 Da. Dari hasil zimogram dengan *blotting* film X-Ray pada gel non SDS diduga enzim protease yang dihasilkan oleh *B. pumilus* (y1) mempunyai berat molekul 30.500 Da. Zimogram dengan kedua metoda tersebut pada gel SDS tidak memberikan hasil yang diharapkan. Zimogram dengan metoda kopolimerisasi gel poliakrilamid-kasein memberikan hasil perkiraan berat molekul enzim sebesar 79.400 Da pada gel non-SDS dan 100.600 Da pada gel SDS. Dari ketiga metode tersebut yang memberikan hasil yang dapat diandalkan adalah metoda zimogram dengan *blotting* pada film X-Ray.



**ANALISIS ZIMOGRAM
ENZIM PROTEASE
Bacillus pumilus (y1)**

SKRIPSI

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor

Oleh
THERESIA WIDYASTUTI
F 28.1583

1995
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
B O G O R

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**ANALISIS ZIMOGRAM
ENZIM PROTEASE
Bacillus pumilus (yl)**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor**

**Oleh
THERESIA WIDYASTUTI
F 28.1583**

**Dilahirkan pada tanggal 24 Januari 1974
di Semarang**

Tanggal Lulus : 13 Desember 1995

**Disetujui,
Bogor, 13 Desember 1995**



Ir. Nuri Andarwulan, MS

Dr. Ir. Maggy T. Suhartono

Dosen Pembimbing II

Dosen Pembimbing I

4. Hansen, Bang Won, Yono, Mel, Irene, Niken, Siska, Pak Slamet, Elisabeth, Wenu, Yahya, Pak Abu, Bu Ika, Bu Eni, Pak Ujang, Pak Anton, dan rekan-rekan di Lab. MB, karena telah menciptakan suasana penelitian yang menyenangkan.
5. Pihak-pihak lain yang telah banyak membantu penulis selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata, penulis berharap semoga laporan ini bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukannya.

Bogor, Desember 1995

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar.....	i
Daftar Isi.....	iii
Daftar Tabel.....	vi
Daftar Gambar.....	vii
Daftar Lampiran.....	ix
I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Protease Mikroba.....	4
B. <i>Bacillus pumilus</i>	7
C. Elektrofosis.....	10
D. Pewarnaan <i>Coomassie Blue</i>	14
E. Teknik Pembuatan Zimogram.....	15
F. Analisis Hasil Elektrofosis dan Zimogram.....	17
III. BAHAN DAN METODA.....	19
A. Bahan dan Alat.....	19
B. Metoda Penelitian.....	20
1. Produksi Enzim (Kawira, 1993).....	20

Hak Cipta: Pendidikan, Penelitian, dan Pengabdian Masyarakat
 1. Dilindungi secara hukum oleh Undang-Undang Republik Indonesia No. 11 Tahun 2002 tentang Sistem Pendidikan Nasional dan Undang-Undang Nomor 17 Tahun 2001 tentang Hukum Hak Cipta dalam Seni.
 2. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan, dipersebarluaskan, atau diperjualbelikan kembali.
 3. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan, dipersebarluaskan, atau diperjualbelikan kembali.
 4. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan, dipersebarluaskan, atau diperjualbelikan kembali.
 5. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan, dipersebarluaskan, atau diperjualbelikan kembali.
 6. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan, dipersebarluaskan, atau diperjualbelikan kembali.

2. Pengukuran Aktivitas Enzim (Bergmeyer, 1983) dan Konsentrasi Protein (Bradford, 1976)....21

3. Persiapan Sampel dan Marker Elektroforesis..23

4. Pembuatan Gel Poliakrilamid.....24

5. Elektroforesis.....25

6. Pewarnaan *Coomassie Blue* (Sigma, 1988).....25

7. Pembuatan Zimogram.....26

 a. Zimogram gel agarosa-substrat.....26

 b. Zimogram kopolimerisasi gel poliakrilamid-substrat kasein.....28

 c. Zimogram film X-Ray.....28

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....30

 A. Produksi Protease.....30

 B. Elektroforesis Dialisat Protease
 B. pumilus (y1).....37

 C. Analisis Berat Molekul Enzim Protease *B. pumilus* dengan Teknik Zimogram.....45

 1. Analisis Zimogram dengan Metoda *Blotting* Gel Agarosa-Substrat.....49

 a. Substrat kasein.....51

 b. Substrat gelatin dan hemoglobin.....53

 2. Analisis Zimogram dengan Metoda Kopolimerisasi Gel Poliakrilamid-Substrat Kasein.....57

 3. Analisis Zimogram dengan Metoda *Blotting* Film X-Ray.....61



V. KESIMPULAN DAN SARAN.....67

 A. Kesimpulan.....67

 B. Saran.....68

DAFTAR PUSTAKA.....70

LAMPIRAN.....74

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang memperjualbelikan sebagian atau seluruhnya karya tulis ini tanpa izin pencetakan dan persetujuan nomor 1
2. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya isi dari karya tulis ini untuk keperluan akademik, penelitian, atau untuk keperluan lain yang tidak merugikan hak cipta penulis.
3. Pengutipan tidak bertanggung jawab yang melanggar hak cipta penulis akan dikenakan sanksi hukum yang berlaku.
4. Dilarang menggunakan karya tulis ini untuk tujuan komersial atau untuk tujuan lain tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. <i>Bacillus</i> penghasil protease ekstraselular dan pH optimumnya.....	5
Tabel 2. Sifat umum protease alkali.....	6
Tabel 3. Sifat-sifat Subtilisin Carlsberg dan BPN.....	8
Tabel 4. Pengujian aktivitas protease.....	22
Tabel 5. Hasil pengujian enzim dengan metoda Bradford dan Bergmeyer.....	37
Tabel 6. Nilai mobilitas relatif dan berat molekul hasil elektroforesis pada gel non SDS.....	47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Polimerisasi gel poliakrilamid.....	12
Gambar 2. Penetapan jumlah protein (Bradford, 1976)...	23
Gambar 3. <i>Blotting</i> PAGE dan agarosa-substrat.....	27
Gambar 4. <i>Blotting</i> PAGE dan film X-ray.....	29
Gambar 5. Kultur <i>B. pumilus</i> (y1) pada media SMA (37°C, 24 jam).....	31
Gambar 6. Kurva hubungan konsentrasi amonium sulfat dan konsentrasi protein filtrat.....	34
Gambar 7. Perbandingan pergerakan protein selama elektroforesis dengan dan tanpa proses dialisis.....	36
Gambar 8. Hasil elektroforesis pada gel non-SDS dan perkiraan jarak migrasinya.....	44
Gambar 9. Kurva standar untuk penentuan berat molekul protein pada gel non-SDS.....	45
Gambar 10. Zimogram gel agarosa-kasein.....	54
Gambar 11. Zimogram gel agarosa-gelatin.....	56
Gambar 12. Zimogram gel agarosa-hemoglobin.....	56
Gambar 13. Zimogram kopolimerisasi non-SDS PAGE- kasein.....	58
Gambar 14. Zimogram kopolimerisasi SDS PAGE- kasein dan perbandingannya dengan <i>molecular marker</i> SDS PAGE.....	60

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Alat elektroforesis.....	74
Lampiran 2. Kurva standar larutan baku Bovine Serum Albumin.....	75
Lampiran 3. Data hubungan konsentrasi amonium sulfat dan konsentrasi protein filtrat.....	76
Lampiran 4. Data uji Bergmeyer dan Bradford.....	77
Lampiran 5. Data elektroforesis pada non-SDS PAGE.....	78
Lampiran 6. Data kurva standar SDS <i>molecular marker</i>	79
Lampiran 7. Elektroforesis gel poliakrilamid.....	80
Lampiran 8. Gel untuk analisis zimogram.....	82

yang dihasilkan dideteksi dengan metode pewarnaan, dimana yang paling banyak dipakai sampai saat ini adalah pewarnaan dengan *Coomassie Brilliant Blue*. Tidak semua pita protein tersebut mengandung aktivitas katalitik, oleh karena itu perlu diteliti pita protein mana yang mengandung enzim. Teknik analisis zimogram yang relatif baru dan masih terbatas penerapannya di Indonesia merupakan teknologi yang dapat menjawab permasalahan tersebut.

Pada prinsipnya, teknik analisis zimogram didasarkan pada reaksi yang spesifik antara enzim dan substrat, sehingga pita protein yang mengandung enzim dapat dideteksi jika pita tersebut mengakibatkan perubahan substrat menjadi produk. Jika produk bersifat tidak larut (*insoluble*), deteksi dapat dilakukan dengan merendam potongan gel yang mengandung pita protein pada pereaksi yang sesuai. Teknik lainnya adalah dengan mengimobilisasi pereaksi pada bahan penyangga, seperti kertas selulosa asetat, kertas saring, gel agarosa, atau film X-ray, serta dapat dilakukan dengan teknik kopolimerisasi substrat dengan gel elektroforesis.

Dalam penelitian ini, teknik elektroforesis dan analisis zimogram akan diterapkan untuk dialisat enzim

protease dari *Bacillus pumilus* (y1) yang diisolasi dari limbah cair tahu, sehingga dapat diperoleh teknik analisis zimogram yang dapat diandalkan untuk mengetahui berat molekul enzim tersebut.

B. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mencari metoda analisis zimogram yang dapat diandalkan untuk evaluasi berat molekul enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus pumilus* (y1) yang diisolasi dari limbah cair tahu.

ekstraselular mempunyai nilai komersial yang lebih tinggi (Ward, 1983). Tabel 1 memperlihatkan beberapa *Bacillus* penghasil protease ekstraselular dan pH optimumnya.

Tabel 1. *Bacillus* penghasil protease ekstraselular dan pH optimumnya a)

Organisme	Jenis protease	pH optimum
<i>B. cereus</i>	netral	7.0
<i>B. licheniformis</i>	netral	6.5-7.5
<i>B. megaterium</i>	netral	7.0
<i>B. polymyxa</i>	netral	6.0-7.2
<i>B. stearothermophilus</i>	netral	6.9-7.2
<i>B. amyloliquefaciens</i>	netral	6.5-7.2
<i>B. proteoliticus</i>	netral	7.5-8.0
<i>B. subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i>	netral	7.0
<i>B. cereus</i>	alkali	10.5-11.0
<i>B. licheniformis</i>	alkali	10.3-10.8
<i>B. pumilus</i>	alkali	10.3-10.8
<i>B. subtilis</i>	alkali	10.3-10.8
<i>B. amyloliquefaciens</i>	alkali	10.2-10.7

a) Ward (1983)

Protease alkali *Bacillus* sp. mempunyai aktivitas tertinggi pada suhu optimum 60°C (Margesin et al., 1992). Pada Tabel 1 terlihat bahwa terdapat dua jenis protease berdasarkan pH optimumnya, yaitu protease netral dan protease alkali. Tabel 2 memperlihatkan sifat-sifat umum protease alkali.

Tabel 2. Sifat umum protease alkali a)

	Subtilisin	Savinase	Protease alkali lain
Berat Molekul	29	27	27
Titik isoelektrik	8.6	9.5	>8.6, <9.5
Klasifikasi	Ser-prot	Ser-prot	Ser-prot
Suhu optimum ($^{\circ}\text{C}$)	60	60	60
pH optimum	11-12	10-12	11
Nilai Q_{10}	2.14	2.23	2.29
E. aktivasi (kJ mol^{-1})	59.09	62.19	64.16
Stabilitas terhadap SDS b)	+++	++	-
Aktivitas spesifik c) ($\text{rACU} \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1}$)	67	229	1135

a) Margesin et al., 1992

b) Enzim diinkubasi dengan 0.1%, 0.5% dan 11% SDS pada 56°C selama 60 menit dan aktivitas ditetapkan melalui teknik zimogram dengan gel gelatin.

c) rACU mg^{-1} adalah satuan daya cerna azokasein per mg protein. 1 rACU sesuai dengan peningkatan absorpsi pada 340 nm sebanyak 0.001 per menit.

B. *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus digolongkan dalam divisi *Protophyta*, kelas *Schizomycetes*, ordo *Eubacteriales*, famili *Bacillaceae* dan genus *Bacillus* (Clifton, 1958). *B. pumilus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, dengan panjang 2-3 μm dan lebar 0.6-0.7 μm , bersifat motil, memberikan hasil positif pada uji katalase dan uji Voges-Prokauer, dapat tumbuh pada larutan NaCl 7%, dapat mendekomposisi kasein, dapat menggunakan asam sitrat, tidak dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit dan tidak dapat menghidrolisis pati. Bakteri ini tumbuh pada suhu maksimum 45-50°C dan suhu minimum 5-15°C (Gordon 1972), serta mempunyai pH optimum alkali (Fogarty dan Kelly, 1979).

Menurut Ward (1983), *B. pumilus* menghasilkan dua jenis proteinase, yaitu proteinase serin alkali dan proteinase logam netral. Proteinase serin alkali yang dihasilkan diberi nama dagang Subtilisin Carlsberg. Tabel 3 menunjukkan sifat-sifat Subtilisin Carlsberg dan Subtilisin BPN. Enzim ini mempunyai spesifitas yang luas, mampu menghidrolisis sebagian besar ikatan peptida dan beberapa ikatan ester, bersifat spesifik terhadap residu asam amino aromatik atau hidrofobik seperti tirosin, fenilalanin, dan leusin

dengan titik pemotongan pada sisi karboksil. Enzim ini dapat menghidrolisis 30%-40% ikatan peptida dalam kasein. Proteinase serin alkali umumnya mempunyai berat molekul 15.000 sampai dengan 30.000 Da, pH optimum aktivitas 8-9, dan inaktif pada pH kurang dari 5 dan lebih dari 10. Proteinase metal netral yang dihasilkan *B. pumilus* mempunyai pH optimum 7, spesifik terhadap asam amino hidrofobik dan asam amino alifatik. Enzim tersebut mengandung logam, dan pada umumnya adalah logam Zn.

Tabel 3. Sifat-sifat Subtilisin Carlsberg dan BPN a)

	Carlsberg	BPN
Titik isoelektrik	9.4	9.1
Bentuk	bulat	-
Berat Molekul	22.277 Da	-
Jumlah asam amino	274	275
Asam amino sisi aktif	Serin 221, Histidin 64, Aspartat 32,	Serin 221, Histidin 54, Aspartat 32
Penghambat	DFP (diisopropil fluorofosfat) PMSF (fenil metil sulfonil fluorida)	sama
pH optimum	8-9	sama
Kebutuhan kation	stabil pada pH 5-11 Ca ⁺⁺ memperbaiki stabilitas pada pH dan suhu ekstrim, tidak sekuat pada Subtilisin BPN	sama, tetapi pengaruh lebih nyata

a) Ward (1983)

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim protease *B. pumilus* (y1) yang diisolasi dari limbah cair tahu. Bakteri ini termasuk bakteri gram positif, berbentuk batang dan menyusun rantai yang cukup panjang (streptobasili), panjangnya 2.7 sampai 4.5 mikrometer dan lebarnya 0.9 mikrometer, menghasilkan spora berbentuk oval, bersifat aerobik, motil, uji katalase dan Voges-Prokauer positif, dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit, tahan terhadap NaCl 7%, tidak dapat menghidrolisis pati, serta tidak dapat menggunakan asam sitrat untuk pertumbuhannya. Berdasarkan pencirian bakteri ini dengan analisa sidik jari asam deoksiribonukleat dengan bantuan PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) menunjukkan bahwa bakteri *B. pumilus* (y1) secara genetik berbeda dengan *B. pumilus*, meskipun penampakan fisiologisnya sama (Likumahwa, 1993).

Berdasarkan penelitian Wijaya *et al.* (1994), *B. pumilus* (y1) menghasilkan dua jenis enzim protease ekstraselular, masing-masing dengan berat molekul 19.500 dan 30.000 D. Suhu dan pH optimumnya berturut-turut adalah 50°C dan pH 9.



C. ELEKTROFORESIS

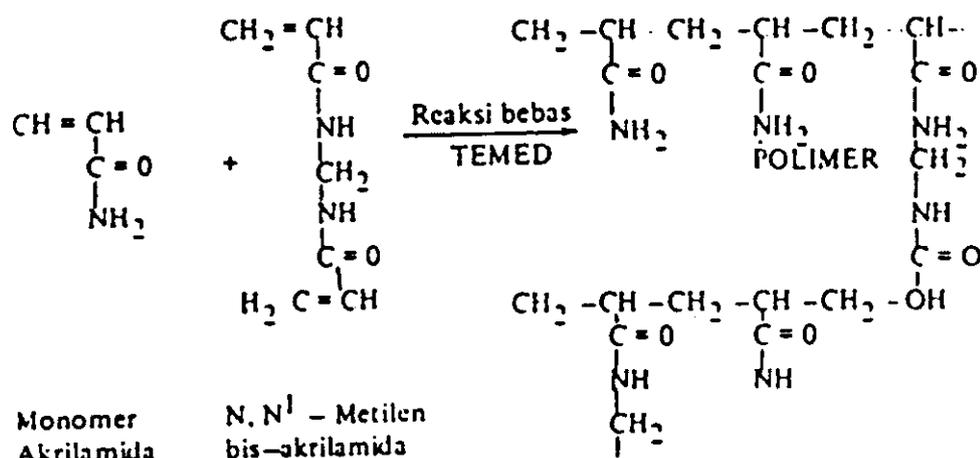
Elektroforesis adalah teknik pemisahan fraksi-fraksi zat berdasarkan migrasi partikel bermuatan atau ion-ion makromolekul di bawah pengaruh medan listrik, karena adanya perbedaan ukuran, bentuk, muatan, atau sifat kimia molekul (Pomeranz dan Meloan, 1980). Perpindahan molekul bermuatan dalam elektroforesis disebabkan oleh aksi dari medan listrik (Morris dan Morris, 1976).

Protein dengan muatan yang berbeda akan terpisah karena molekul tersebut akan bergerak ke arah elektroda yang polaritasnya berlawanan dengan muatan molekul tersebut. Berdasarkan pemisahan tersebut, elektroforesis dapat digunakan untuk menentukan berat molekul, mendeteksi kemurnian dan kerusakan protein, menetapkan titik isoelektrik, serta memisahkan spesies-spesies molekuler yang berbeda secara kualitatif dan kuantitatif (Boyer, 1986).

Elektroforesis dapat diklasifikasikan menjadi elektroforesis cairan dan elektroforesis zona. Elektroforesis cairan menggunakan larutan buffer sebagai media, sedangkan elektroforesis zona menggunakan kertas atau gel sebagai media penyangga, sehingga dapat menghilangkan gangguan konveksi (Boyer, 1986).

Elektroforesis gel terbagi menjadi elektroforesis gel pati dan gel poliakrilamid. Gel poliakrilamid relatif lebih baik karena ukuran porinya dapat diatur; yaitu dibuat seragam (kontinyu), dua macam (diskontinyu), atau bervariasi sepanjang gel (gradien); bersifat transparan sehingga dapat diwarnai pada daerah sinar tampak dan ultra violet; serta bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan sampel (Nur dan Adijuwana, 1988).

Gel poliakrilamid terbentuk oleh adanya polimerisasi dari monomer akrilamid menjadi rantai yang panjang oleh adanya ikatan silang oleh komponen N,N'-metilen bisakrilamid. Gambar 1 menunjukkan struktur dari monomer dan struktur akhir dari polimer gel. Polimerisasi dari akrilamid ini diawali dengan adanya reaksi antara amonium persulfat maupun riboflavin sebagai katalis dengan N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED). Kompleks amonium persulfat-TEMED mengkatalisa pembentukan radikal bebas dari persulfat, yang selanjutnya berfungsi sebagai inisiator polimerisasi (Hames dan Rickwood, 1987).



Gambar 1. Polimerisasi gel poliakrilamid (Hames dan Rickwood, 1987)

Ukuran pori gel poliakrilamid dapat ditentukan dengan mengatur jumlah akrilamid per unit volume medium reaksi dan derajat ikatan silang. Makin rendah konsentrasi poliakrilamid yang digunakan dan makin kecil ukuran molekul yang akan dipisahkan, maka mobilitas molekul tersebut akan semakin besar. Gel poliakrilamid dengan konsentrasi standar 7.5% dapat memisahkan dengan baik senyawa yang mempunyai berat molekul 10.000 - 1.000.000, sedangkan gel poliakrilamid dengan konsentrasi 3.5% dapat digunakan untuk memisahkan molekul dengan berat molekul 1.000.000 - 5.000.000 (Boyer, 1986).

Berdasarkan bentuknya, gel poliakrilamid dapat dibagi menjadi bentuk batang dan bentuk lempeng tipis.

Elektroforesis dapat dilakukan secara vertikal maupun secara horisontal, sehingga pengaruh gravitasi dapat dihindarkan (Boyer, 1986).

Elektroforesis gel poliakrilamid (PAGE) dapat digunakan untuk penentuan berat molekul, mobilitas relatif, muatan bersih, koefisien difusi nyata, dan uji homogenitas protein (Maurer, 1974).

Penambahan SDS (Sodium Dodesil Sulfat) pada gel poliakrilamid menghasilkan SDS-PAGE yang digunakan untuk sampel yang terdenaturasi (Mayes et al., 1987). SDS adalah deterjen anionik yang bersama dengan β -merkaptotanol dan pemanasan akan merusak struktur tiga dimensi protein dengan cara memecah ikatan disulfida yang selanjutnya tereduksi menjadi gugus sulfidril (Smith, 1984). SDS akan mengikat protein terdenaturasi pada sisi hidrofobik dengan perbandingan tetap, 1.4 gram SDS per gram protein (Smith, 1984). SDS-PAGE digunakan pada pH netral, dimana pada pH 7 SDS akan membentuk kompleks negatif dengan protein, sehingga sampel akan bergerak ke arah elektroda positif. Pergerakan kompleks SDS-protein yang berukuran besar akan mempunyai mobilitas yang lebih kecil. SDS-PAGE dimanfaatkan untuk penetapan berat molekul, jumlah rantai polipeptida, dan penentuan protein monomerik atau oligomerik (Nur dan Adijuwana, 1988).

D. PEWARNAAN *COOMASSIE BLUE*

Pita protein hasil pemisahan dengan elektrofore-
sis diperjelas dengan teknik pewarnaan, umumnya dengan
menggunakan *Coomassie Brilliant Blue*, sehingga disebut
teknik pewarnaan *Coomassie Blue*. Teknik pewarnaan
Coomassie Blue hanya dapat mendeteksi protein dalam
jumlah besar, yaitu $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Dunn, 1989) dan tidak
sesuai untuk protein yang bersifat asam (Scopes,
1987). Jumlah molekul pewarna yang terikat oleh
protein tergantung pada muatan positif protein, yaitu
1.5 - 3 molekul *Coomassie Brilliant Blue* per muatan
positif protein (Tal et al., 1980).

Teknik pewarnaan didahului oleh fiksasi protein
dengan cara mendenaturasi protein dengan asam, umumnya
dengan campuran metanol-asam asetat-air, asam sulfosa-
lisilat, formaldehid, glutaraldehid, TCA (*Trichloroa-
cetic Acid*), atau asam perklorat 5-10% (Laemmli, 1970;
Smith, 1984; Scopes, 1987; Dunn, 1989). Guna dari
fiksasi tersebut adalah untuk mengendapkan dan mengi-
mobilisasi pita-pita protein pada gel dan menghilang-
kan komponen-komponen non-protein yang dapat menggang-
gu pengikatan pewarna, seperti SDS dan senyawa amfolit
(Scopes, 1987).

Syarat dari pewarna yang digunakan untuk *staining* adalah dapat bereaksi dengan molekul sampel yang dipisahkan namun tidak bereaksi dengan gel. Ikatan antara pewarna dan gel adalah ikatan non-kovalen, sehingga mudah dilepaskan dengan pencucian secara intensif dan penyinaran (Maurer, 1974).

Proses penghilangan warna (*destaining*) dilakukan dengan merendam gel dalam larutan peluntur sampai diperoleh latar belakang yang relatif jernih, sehingga pita protein yang dihasilkan dapat dengan jelas diamati (Nur dan Adijuwana, 1988). Waktu *destaining* yang diperlukan dipengaruhi oleh ketebalan gel dan konsentrasi poliakrilamid (Dunn, 1989).

E. TEKNIK PEMBUATAN ZIMOGRAM

Dalam proses pemurnian enzim, informasi tentang jumlah protein, kontaminasi, dan aktivitas katalitik diperoleh melalui elektroforesis dan *isoelectric focusing*. Namun data yang diperoleh tidak selalu menunjukkan daya katalitik enzim yang sebenarnya karena adanya kontaminan, isoenzim, atau enzim lain dari kelas yang sama, dalam hal ini hidrolase. Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan meneliti aktivi-

berbagai metode tersebut masih ditemui banyak kelemahan, antara lain : persiapan gel membutuhkan waktu yang lama, waktu simpan terbatas, waktu transpor dari gel pemisah ke peyangga membutuhkan waktu yang lama (>48 jam), penggunaan komponen pewarna dan substrat kromogenik yang dapat membahayakan kesehatan, peralatan bersifat kamba (*bulky*), serta proses transpor yang tidak dapat diamati secara visual. Untuk mengatasi hal itu, digunakan metode film X-Ray (Paech et al., 1993).

Penggunaan film foto untuk mendeteksi aktivitas proteolitik bukan merupakan teknik yang baru, misalnya pada tahun 1951 Wallenfels dan von Pechman melakukan pelapisan gelatin pada film untuk meneliti aktivitas protease pada kertas elektrogram, dimana akan terbentuk zona bening pada daerah pita protease yang menghidrolisa substrat (Paech et al., 1993).

F. ANALISIS HASIL ELEKTROFORESIS DAN ZIMOGRAM

Analisis hasil elektroforesis didasarkan pada mobilitas elektroforetik protein. Mobilitas partikel adalah kecepatan yang dicapai oleh partikel tersebut pada suatu medan listrik, dimana pada kondisi yang sama besarnya mobilitas selalu sama untuk setiap ion,

sehingga diperoleh hubungan antara berat molekul dan mobilitasnya (Nur dan Adijuwana, 1988). Mobilitas relatif protein adalah perbandingan jarak antara titik awal ke pita protein dengan titik awal ke titik akhir elektroforesis, atau perbandingan jarak migrasi protein dengan jarak migrasi zat warna (Hames dan Rickwood, 1987).

Estimasi Berat Molekul (BM) protein dapat dilakukan berdasarkan protein standar yang sudah diketahui BM-nya dengan dua cara. Cara pertama dilakukan dalam dua tahap, yaitu mencari hubungan antara mobilitas relatif protein standar dengan konsentrasi gel yang digunakan, selanjutnya dibuat kurva standar yang menghubungkan BM dengan kemiringan kurva pertama. Cara kedua dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE yang mampu memisahkan protein berdasarkan ukuran atau berat molekulnya, kurva standar yang diperoleh merupakan hubungan linier antara mobilitas relatif protein standar dengan logaritma BM-nya (Conn et al., 1987).

Analisis zimogram dilakukan dengan membandingkan signal pada zimogram dengan gel pewarnaan biasa, sehingga dapat ditentukan pita mana yang mengandung enzim (Scopes, 1987).



Halaman ini adalah hak cipta milik IPB University dan tidak boleh disebarluaskan atau diperjualbelikan kembali. Untuk informasi lebih lanjut, silakan kunjungi situs web IPB University di www.ipb.ac.id.

III. BAHAN DAN METODA

A. BAHAN DAN ALAT

Kultur bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur *B. pumilus* (y1) yang diisolasi oleh Likumahwa (1993), dengan media Limbah Cair Tahu (LCT) yang diperoleh dari daerah Panaragan, Bogor, dan susu skim. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah amonium sulfat, pereaksi untuk uji Bergmeyer, pereaksi untuk uji Bradford, Trizma Base, HCl, glisin, NaOH, SDS, air distilata, air bebas ion, akrilamid-bisakrilamid, amonium persulfat, TEMED, buffer fosfat, gliserol, bromofenol blue, Coomassie Brilliant Blue R-250, metanol, asam asetat glasial, film X-Ray, kasein, gelatin, hemoglobin, agarosa, CaCl_2 , buffer borat, triton X-100.

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, elektroforesis aparatus, sentrifuse dengan pengatur suhu, inkubator, vorteks, magnetic stirrer, heater, shaker, mikropipet, eppendorf, timbangan, refrigera-tor, kertas saring, alat dialisis, nampan, lempeng kaca, beban.

B. METODA PENELITIAN

1. Produksi Enzim (Kawira, 1993)

Inokulum *B. pumilus* (y1) dibuat dengan cara melarutkan satu kultur stok *B. pumilus* (y1) yang diisolasi oleh Likumahwa (1993) pada agar miring dengan 100 ml limbah cair tahu yang mengandung 0.5 % skim dan diinkubasi pada *shaker* dengan suhu 37°C dan kecepatan 200 rpm selama 10 jam.

Produksi enzim dilakukan dengan menambahkan kultur inokulum *B. pumilus* (y1) sebanyak 10 % ke dalam media fermentasi (limbah cair tahu dan 0.5 % skim) serta diinkubasi pada *shaker* dengan suhu 37°C dan kecepatan 200 rpm selama 12 jam. Selanjutnya disentrifus pada kecepatan 3000 rpm dan suhu 0-5°C selama 10 menit, endapan sel dibuang, sedangkan filtratnya ditambah ammonium sulfat dengan konsentrasi 55 % (w/v) dan didiamkan semalam pada suhu 4°C, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm dan suhu 0-5°C selama 10 menit. Endapan enzim yang diperoleh dilarutkan dalam buffer fosfat 0.01 M pH 8.0 dengan volume minimal dan didialisis semalam.

2. Pengukuran Aktivitas Enzim (Bergmeyer, 1983) dan Konsentrasi Protein (Bradford, 1976)

Aktivitas enzim ekstrak kasar, endapan enzim setelah penambahan amonium sulfat, dan dialisat diukur dengan metoda Bergmeyer dan konsentrasi protein diukur dengan metoda Bradford.

Pengujian aktivitas protease didasarkan pada reaksi hidrolisis kasein oleh protease menjadi peptida dan asam amino. Asam amino dipisahkan dari substrat yang tersisa dengan penambahan TCA atau asam perklorat. Asam amino yang terbentuk akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang tidak terhidrolisa akan mengendap. Asam-asam amino yang telah diisolasi dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm (ultra violet) atau diwarnai dulu dengan pereaksi Folin Ciocalteau dan diukur absorbansinya pada daerah sinar tampak (578 nm). Pengujian teknis dari aktivitas protease dengan metoda Bergmeyer dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan perjanjian internasional, aktivitas protease dinyatakan dalam Internasional Unit (IU). Satu IU protease menunjukkan jumlah enzim yang dapat menghasikan 1 mikromol produk (tirosin)

per menit. Unit aktivitas tiap sampel dapat dihitung dengan persamaan :

$$UA = \frac{(A_{sp} - A_{bl})}{(A_{st} - A_{bl})} \times P \times \frac{1}{T}$$

dimana: UA = jumlah tirosin yang dihasilkan per ml enzim per menit

A_{sp} = nilai absorbansi sampel

A_{bl} = nilai absorbansi blanko

A_{st} = nilai absorbansi standar

P = faktor koreksi

T = lama reaksi (menit)

Tabel 4. Pengujian aktivitas protease a)

Pereaksi	Blanko (ml)	Standar (ml)	Sampel (ml)
Buffer Borat 0.05 M pH 8	1.00	1.00	1.00
Substrat Casein 20 mg/ml pH 8	1.00	1.00	1.00
Enzim	-	-	0.20
Tirosin standar 5 mmol/l	-	0.20	-
Akuades	0.20	-	-
Inkubasi (55°C, 10 menit)			
TCA 0.1 M	2.00	2.00	2.00
Akuades	-	-	0.20
Enzim	0.20	0.20	-
Inkubasi (37°C, 10 menit), sentrifus (4000 rpm, 10 menit)			
Filtrat	1.50	1.50	1.50
Na ₂ CO ₃	5.00	5.00	5.00
Folin 1:2	1.00	1.00	1.00

Inkubasi (37°C, 20 menit), ukur absorbansi pada 578 nm

a) Bergmeyer dan Grassl (1983)

Molecular marker non SDS (Sigma) terdiri dari α -Lactalbumin (14.200 Da), Carbonic Anhidrase (29.000 Da), Albumin Egg (45.000 Da), Albumin Bovine monomer (66.000 Da), dan Albumin Bovine dimer (132.000 Da).

Molecular marker SDS-7 (Sigma) terdiri dari α -Lactalbumin (14.200 Da), Tripsin inhibitor (20.100 Da), Tripsinogen (24.000 Da), Carbonic anhidrase (29.000 Da), Gliseraldehid-3P-dehidrogenase (36.000 Da), Albumin egg (45.000 Da), dan Albumin bovine (66.000 Da).

4. Pembuatan Gel Poliakrilamid

Bahan-bahan untuk *stacking gel* dan *resolving gel* seperti yang tertera pada Lampiran 7 dicampur dan diaduk diatas *magnetic stirrer*. *Resolving gel* dipipet perlahan-lahan ke dalam cetakan gel dan perlu dijaga agar tidak terbentuk gelembung udara, sisir dimasukkan dan diusahakan agar tinggi *resolving gel* lebih kurang 1 cm di bawah dasar *well* dari sisir tersebut. Setelah *resolving gel* mulai membeku, *stacking gel* dipipet ke dalam cetakan gel sampai mencapai permukaan atas cetakan. Gel di-

biarkan terpolimerisasi sempurna, kemudian sisir diangkat dan well dibersihkan dari sisa-sisa gel yang tidak terpolimerisasi sempurna.

5. Elektroforesis

Gel dipasang pada *electrophoresis* aparatus, kemudian buffer reservoir dituang, dan sampel disuntikkan pada well yang tersedia. Selanjutnya dihubungkan dengan sumber arus, 1 jam pertama Voltase diset pada 100 V, dan selanjutnya 200 V sampai running selesai. Sumber arus dimatikan, gel dikeluarkan, dan siap untuk pewarnaan *Coomassie Blue* dan pembuatan zimogram.

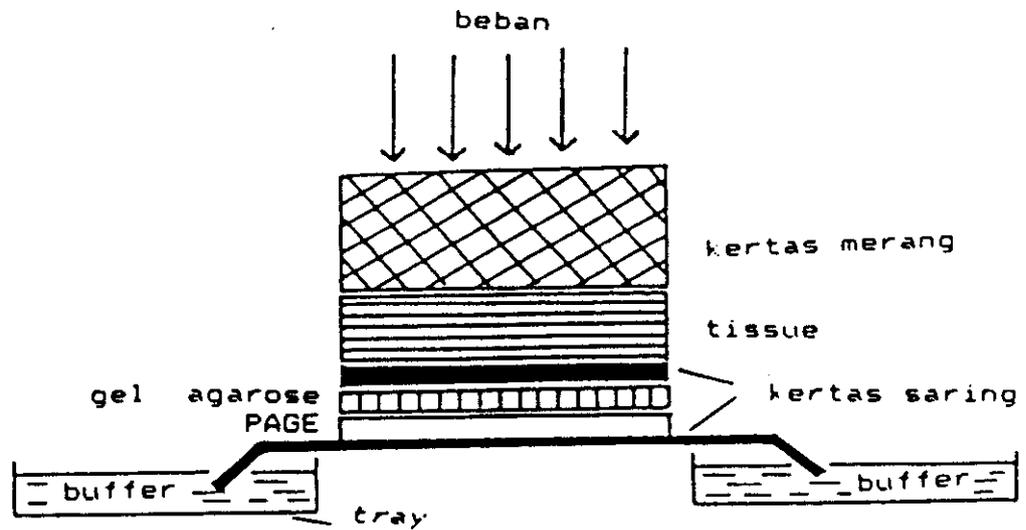
6. Pewarnaan *Coomassie Blue* (Sigma, 1988)

Gel direndam larutan pewarna (0.25% *Coomassie Brilliant Blue* R-250, 40% metanol, 10% asam asetat glasial) selama 10-20 jam, dibilas dengan air destilata, dan direndam larutan peluntur (10% asam asetat glasial + 40% metanol) sampai diperoleh pita-pita protein yang berwarna biru dengan latar belakang jernih.

5. Pembuatan Zimogram

a. Zimogram dari gel agarosa- substrat

Bahan untuk gel agarosa seperti tertera pada Lampiran 8 dicampur dan dipanaskan dengan *heater* sampai mendidih dan warnanya bening, kemudian dimasukkan cetakan, dibiarkan membeku, dan dikeluarkan dari cetakan. Peralatan *blotting* disiapkan sebagai berikut : buffer transfer (buffer borat 0.025 M pH 8.0 + CaCl_2 12mM) dituang ke dalam tray, sebuah tray lain yang berukuran lebih kecil dipasang terbalik di atasnya, kemudian berturut-turut dipasang 4 lembar kertas saring yang telah dijenuhi dengan buffer transfer, PAGE yang berisi pita protein, gel agarose yang mengandung substrat, 4 lembar kertas saring, beberapa lembar kertas tissue yang membentuk ketebalan kira-kira 0.5 cm, setumpuk kertas merang dan terakhir beban yang terdiri dari lempeng kaca, kemudian ditutup dengan *plastic wrap*, dan diinkubasi pada 37°C selama 12 jam. Susunan tersebut ditunjukkan oleh Gambar 3.



Gambar 3. Blotting PAGE dan agarosa-substrat

Gel agarosa dengan substrat kasein dan gelatin kemudian diwarnai dengan metode Coomassie Blue selama semalam, dan pelunturan warna dilakukan dengan larutan *destaining*, sehingga dapat terdeteksi aktivitas protease yang ditunjukkan oleh pita bening dengan latar belakang biru tua. Pada gel agarosa dengan substrat haemoglobin, aktivitas protease dapat langsung dideteksi oleh adanya pita bening dengan latar belakang merah.

b. Zimogram kopolimerisasi gel poliakrilamid-substrat kasein (Milton et al, 1992)

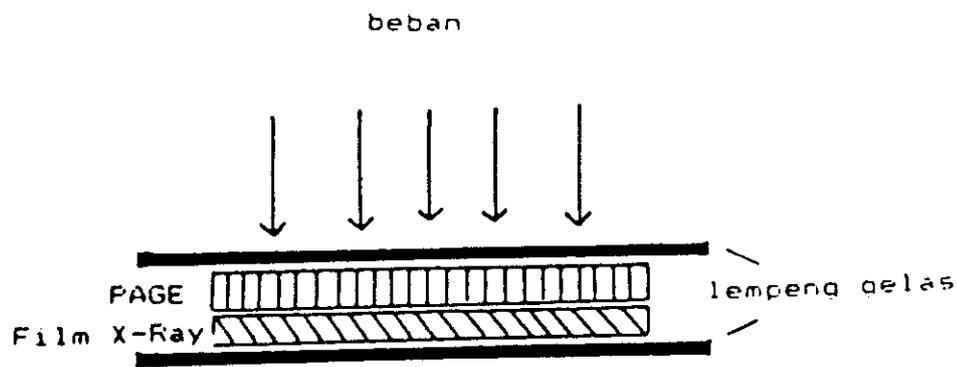
Sampel dielektroforesis pada SDS-PAGE yang mengandung 0.2% kasein, kemudian direndam dalam 2.5 % Triton X-100 pada suhu kamar selama 1 jam, dan direndam dalam 0.1 M Glisin pH 8.3, serta diinkubasi selama 5 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya gel diwarnai dengan Coomassie Blue dan dilunturkan warnanya dengan cairan *destaining*. Aktivitas protease ditandai dengan terbentuknya pita bening dengan latar belakang biru tua.

c. Zimogram film X-Ray (Paech et al., 1993)

Film X-Ray dihidrasi dengan air distilasi selama 1 jam, kemudian dikeringudarkan dan ditempelkan pada PAGE yang berisi pita protein dan diletakkan diantara 2 lempeng gelas, diberi beban, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama semalam. Film dilepaskan dan direndam dengan buffer borat 0.05 M pH 8.0 yang mengandung 12 mM CaCl₂, diinkubasi pada 37°C semalam dan dilakukan *destaining* dengan air distilasi pada suhu kamar. Zimogram film X-Ray kemudian

dikeringudarkan. Aktivitas protease ditandai oleh terbentuknya pita bening dengan latar belakang hitam.

Susunan *blotting* PAGE dengan film X-Ray ditunjukkan oleh Gambar 4.



Gambar 4. *Blotting* PAGE dan Film X-Ray

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PRODUKSI PROTEASE

Tahap pertama dari penelitian ini adalah produksi enzim protease dari *B. pumilus* (y1) yang telah diisolasi oleh Likumahwa (1993). Prosedur produksi yang digunakan adalah berdasarkan penelitian Kawira (1993).

Pertama-tama dibuat kultur stok dengan cara menyegarkan kultur bakteri dari media gliserol 40%, berturut-turut ke media Luria Broth (LB), Skim Milk Agar (SMA), dan Luria Agar (LA) miring. Jika bakteri penghasil enzim protease ditumbuhkan pada media bakterial yang spesifik, dalam hal ini SMA, maka susu skim akan diuraikan menjadi peptida-peptida, sehingga media yang mula-mula keruh dapat menjadi bening dan ditandai dengan terbentuknya halo di sekitar koloni (Fardiaz, 1989). Penampakan kultur *B. pumilus* yang ditumbuhkan pada media SMA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam diperlihatkan pada Gambar 5.

Dari LA miring selanjutnya dibuat kultur inokulum dengan media Limbah Cair Tahu (LCT) dengan penambahan 0.5% skim. Fermentasi untuk ekstraksi protease menggunakan media yang sama dengan kultur inokulum, yaitu LCT dengan penambahan 0.5% skim.



Gambar 5. Kultur *B. pumilus* (y1) pada media SMA (37° C, 24 jam)

Penggunaan LCT bertujuan untuk mendapatkan sumber senyawa nitrogen yang murah dan untuk memanfaatkan limbah yang dihasilkan dari industri pengolahan tahu. Sedang penambahan 0.5% skim berguna sebagai substrat pertumbuhan bakteri dan sebagai sumber karbon untuk metabolisme bakteri.

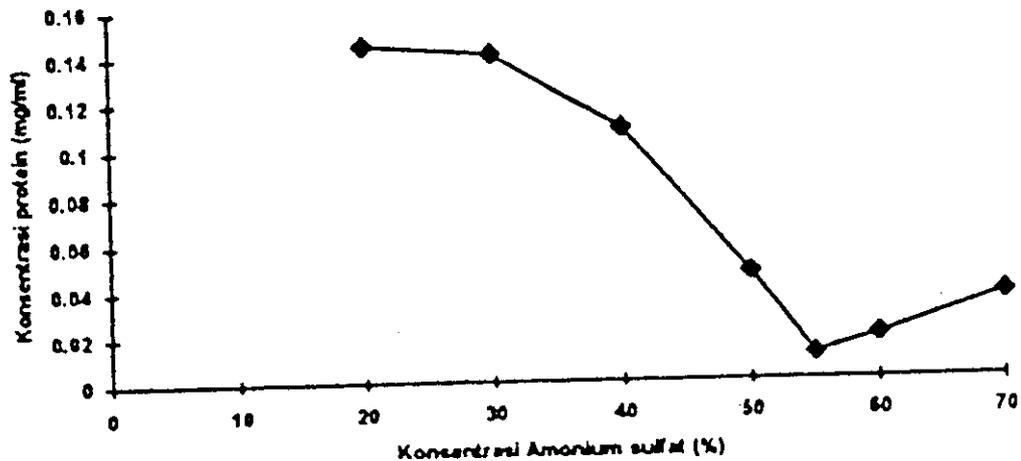
Hasil fermentasi enzim dipisahkan dari sel-sel bakteri dan senyawa-senyawa lainnya, sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim. Salah satu metoda tertua dan umum dalam pemurnian dan fraksinasi protein adalah dengan pengendapan dalam larutan garam netral. Metoda

ini dikenal dengan nama *salting out*. Prinsip *salting out* dapat dijelaskan sebagai berikut : larutan enzim adalah larutan koloid yang bersifat liofil sehingga mempunyai afinitas yang besar terhadap pelarut, mempunyai muatan yang berasal dari ionisasi, dan dapat diendapkan dengan cara mengganggu faktor stabilitasnya, yaitu keseimbangan mantel air dan muatan, dengan cara menambahkan elektrolit secara berlebih yang dapat menyebabkan koagulasi. Pada kekuatan ion rendah, terjadi proses *salting in*, dimana gugus protein yang terionisasi dikelilingi oleh ion lawan dan molekul air, sehingga interaksi antar protein berkurang dan kelarutan meningkat. Jika kekuatan ion meningkat, akan lebih banyak air yang diikat oleh ion sehingga tidak cukup untuk hidrasi protein, interaksi antar molekul protein akan meningkat, dan molekul-molekul protein akan membentuk agregat dengan kelarutan menurun, kemudian mengendap, dan terjadilah proses *salting out*.

Garam netral yang biasa dipakai adalah amonium sulfat dan sodium sulfat. Keuntungan dari penggunaan amonium sulfat adalah murah harganya serta punya solubilitas tinggi. Penggunaan sodium sulfat lebih terbatas karena harus digunakan pada 35 - 40°C untuk memperoleh solubilitas yang memadai (Scopes, 1987).



Dari perhitungan tersebut, diperoleh bahwa 55% amonium sulfat setara dengan 35.1% (w/v) amonium sulfat.



Gambar 6. Kurva hubungan konsentrasi amonium sulfat dan konsentrasi protein filtrat

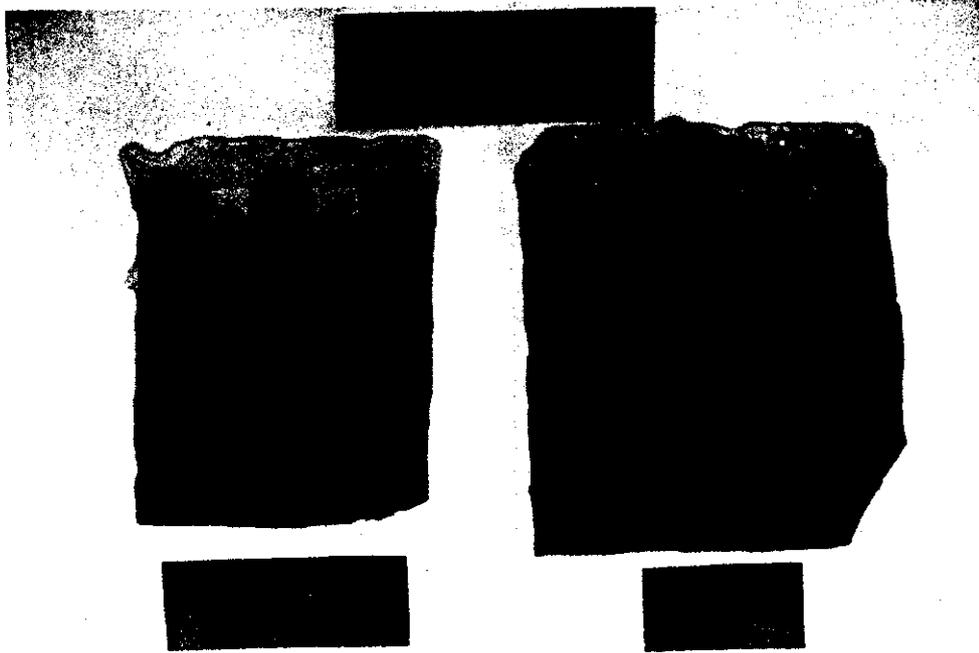
Setelah proses ekstraksi dan pengendapan, dilakukan tahap penghilangan garam dari filtrat atau dikenal dengan proses *desalting*. Ada dua metoda *desalting*, yaitu dengan dialisis dan ultrafiltrasi. Pada penelitian ini endapan enzim yang telah dilarutkan dalam buffer fosfat 0.01 M pH 8.0 didialisis dengan menggunakan membran selulosa (Sigma Dialysis Tubing D-9652) dalam 0.01 M buffer fosfat pH 8.0. Kantung dialisis yang digunakan dapat menahan molekul dengan berat molekul lebih dari 12.000 D, sehingga enzim protease *B. pumilus* yang umumnya mempunyai berat molekul antara

15.000-30.000 D tetap tertahan di dalam kantung dialisis, dan diharapkan molekul-molekul selain protein dapat berdifusi keluar. Molekul-molekul kecil akan keluar dari membran sampai dengan tercapainya keseimbangan tekanan osmotik, oleh karena itu buffer harus selalu diganti-ganti.

Salah satu kendala dari proses dialisis ini adalah penurunan aktivitas dari enzim protease, padahal proses dialisis ini mutlak dilakukan untuk menghilangkan garam yang dapat mengganggu pergerakan protein dalam elektroforesis. Gambar 7 menunjukkan perbandingan hasil zimogram metoda kopolimerisasi dengan sampel yang didialisis dan tidak didialisis. Terlihat bahwa pergerakan pita protein yang tidak mengalami proses dialisis tidak lurus tetapi melengkung oleh adanya gangguan konsentrasi garam.

Turunnya aktivitas enzim protease tersebut diduga disebabkan oleh keluarnya kofaktor logam berberat molekul rendah dari kantung dialisis dan terpisah dari enzim, sehingga enzim kehilangan sebagian aktivitasnya. Berdasarkan penelitian Wong (1995), direkomendasikan bahwa CaCl_2 6 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim protease *B.pumilus* (y1) selama penyimpanan. Oleh karena itu, untuk keperluan analisis selanjutnya, yaitu metoda zimogram yang memerlukan aktivitas enzim

yang cukup tinggi, ditambahkan 6 mM CaCl_2 ke dalam dialisat.



Gambar 7. Perbandingan pergerakan protein selama elektroforesis dengan dan tanpa proses dialisis

Tahap selanjutnya dalam penelitian ini, yaitu elektroforesis dan zimogram, memerlukan sampel enzim yang mempunyai konsentrasi protein yang tinggi, sehingga pita-pita protein dapat dideteksi dengan metoda pewarnaan *Coomassie Blue*, selain itu enzim juga harus mempunyai aktivitas katalitik yang tinggi sehingga dapat mengkatalisis hidrolisis substrat pada teknik zimogram. Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian konsentrasi protein dengan metoda Bradford (1976) dan

aktivitas protease dengan metoda Bergmeyer (1983) dalam tiap tahap pemurnian enzim yang dihasilkan. Data aktivitas, konsentrasi protein dan aktivitas spesifik dari enzim yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian enzim dengan metoda Bradford dan Bergmeyer

Sampel	Aktivitas enzim (IU/ml)	Konsentrasi protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (IU/mg)
Ekstrak kasar	0.036	0.37	0.097
Pengendapan	0.365	1.29	0.283
Dialisat	0.106	1.36	0.078
Dialisat +CaCl ₂	0.838	1.36	0.616

B. ELEKTROFORESIS DIALISAT PROTEASE *B. pumilus* (y1)

Setelah diperoleh sampel enzim dengan konsentrasi protein dan aktivitas yang tinggi, selanjutnya sampel enzim disiapkan untuk elektroforesis. Tujuan lebih lanjut dari elektroforesis ini adalah penentuan berat molekul enzim protease *B. pumilus* (y1) dengan metoda

zimogram berdasarkan aktivitas katalitik enzim protease.

Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamid yang berbentuk lempeng dan elektroforesis dilakukan secara vertikal. Alat elektroforesis yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 1. Elektroforesis pada gel yang berbentuk lempeng mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan gel berbentuk batang, antara lain adalah dalam banyaknya jumlah sampel yang dapat dielektroforesis secara bersama-sama, serta ukuran ketebalannya yang lebih tipis sehingga panas yang diproduksi per cm^2 lebih sedikit, selain itu gel yang tipis ini memudahkan difusi zat pewarna dan zat peluntur selama proses *staining* dan *destaining*.

Konsentrasi poliakrilamid yang digunakan dapat divariasikan dengan dua cara, yaitu variasi dalam total kandungan akrilamid dan variasi persentase ikatan silang (N,N, metilen bisakrilamid). Menurut Scopes (1987), untuk protein berukuran 10^6 D, digunakan 3-4% akrilamid dan 0.1% bisakrilamid, sedangkan untuk protein berukuran 10^4 digunakan 15% akrilamid dan 1% bisakrilamid. Pada umumnya digunakan 7-10% akrilamid, dan dalam penelitian ini digunakan 7.5% akrilamid untuk menghasilkan resolusi pemisahan pita protein yang paling baik.

Gel yang digunakan terdiri dari *stacking gel* dan *resolving gel*, dimana pemisahan pita-pita protein baru terjadi pada *resolving gel*. *Stacking gel* sendiri sebenarnya berfungsi untuk mengatasi masalah terben-
tuknya pita protein yang kurang jelas dan tidak tajam akibat besarnya volume sampel yang disuntikkan ke dalam gel. *Stacking gel* dapat mengkonsentrasikan sampel menjadi pita tipis sebelum terpisah pada *re-
solving gel*. Dengan demikian hal ini memungkinkan untuk mengaplikasikan volume protein dalam jumlah besar tanpa mengurangi resolusinya. Dalam penelitian ini *stacking gel* sangat perlu digunakan mengingat untuk keperluan analisis zimogram yang membutuhkan aktivitas enzim yang cukup tinggi akan memerlukan sampel dengan volume yang cukup besar.

Sebelum disuntikkan ke dalam gel, sampel protein dilarutkan lebih dulu dalam pelarut sampel, yang terdiri dari buffer fosfat 0.01 M pH 8.0, gliserol, dan *Bromofenol blue* untuk non-SDS PAGE, dan ditambah SDS pada SDS-PAGE. Gliserol berfungsi untuk mening-
katkan densitas sampel sehingga ketika sampel disun-
tikkan ke dalam gel, sampel dapat bergerak dengan sendirinya ke bawah dan memenuhi dasar dari sumur gel, serta tidak bercampur dengan buffer reservoir. *Bromo-*

fenol blue berfungsi sebagai pewarna tanda yang dapat menandai titik akhir elektroforeis, sehingga dapat ditentukan perbandingan antara jarak migrasi protein dan jarak migrasi pewarna tanda untuk menentukan berat molekul protein.

Menurut Hames dan Rickwood (1987), jumlah protein yang dapat terdeteksi dengan baik adalah 1-10 μg untuk tiap polipeptida, dan 50-100 μg untuk campuran protein. Dalam penelitian ini, jumlah sampel yang perlu disuntikkan untuk memperoleh penampakan pita protein yang paling baik adalah 40 μg .

Keberhasilan pemisahan protein dengan elektroforesis dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain : buffer, suhu, waktu, dan besarnya arus listrik yang digunakan (Nur dan Adijuwana, 1988). Dalam penelitian ini digunakan buffer reservoir Tris Glisin pH 8.3 dan buffer resolving Tris-HCl pH 8.8. Elektroforesis dilaksanakan pada suhu 4°C untuk mengurangi kenaikan suhu yang tinggi selama elektroforesis yang dapat menyebabkan pemisahan yang kurang baik serta mengakibatkan denaturasi protein, sehingga enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Waktu yang diperlukan untuk elektroforesis berkaitan erat dengan arus yang digunakan, dimana semakin tinggi arus yang digunakan, maka semakin pendek waktu yang dibutuhkan, tetapi suhu akan

meningkat. Dalam penelitian ini digunakan arus sebesar 2-3 mA per sumur pada satu jam pertama, serta 4-6 mA per sumur untuk waktu selanjutnya, atau jika elektroforesis dijalankan pada tegangan konstan, setara dengan 100 V pada satu jam pertama dan 200 V untuk waktu selanjutnya. Lama elektroforesis berkisar antara 5-8 jam.

Buffer berfungsi untuk mempertahankan pH, baik dalam reservoar maupun gel, serta sebagai pembawa aliran listrik. Oleh karena itu pemilihan buffer yang digunakan hendaknya memperhatikan syarat-syarat sebagai berikut : buffer tidak bereaksi dengan makromolekul yang akan dipisahkan, pH yang dipilih harus dapat menyebabkan pemisahan campuran makromolekul, kekuatan ionik dan konsentrasi buffer harus tepat. Reaksi antara buffer dengan makromolekul akan menyebabkan perubahan kecepatan pergerakan molekul dalam medan listrik, sehingga 1 pita dapat terlihat lebih dari 1. Menurut Scopes (1987), nilai pH yang umum digunakan untuk pemisahan protein adalah 8-9, dimana sebagian besar protein bermuatan negatif, dan bergerak ke anoda. Jika konsentrasi elektrolit di dalam gel terlalu rendah maka makromolekul akan bergerak terlalu cepat, sehingga pita yang terbentuk tidak tajam, sebaliknya jika konsentrasi elektrolit terlalu tinggi

merupakan asam amino penyusun hampir semua protein dasar (Scopes, 1987).

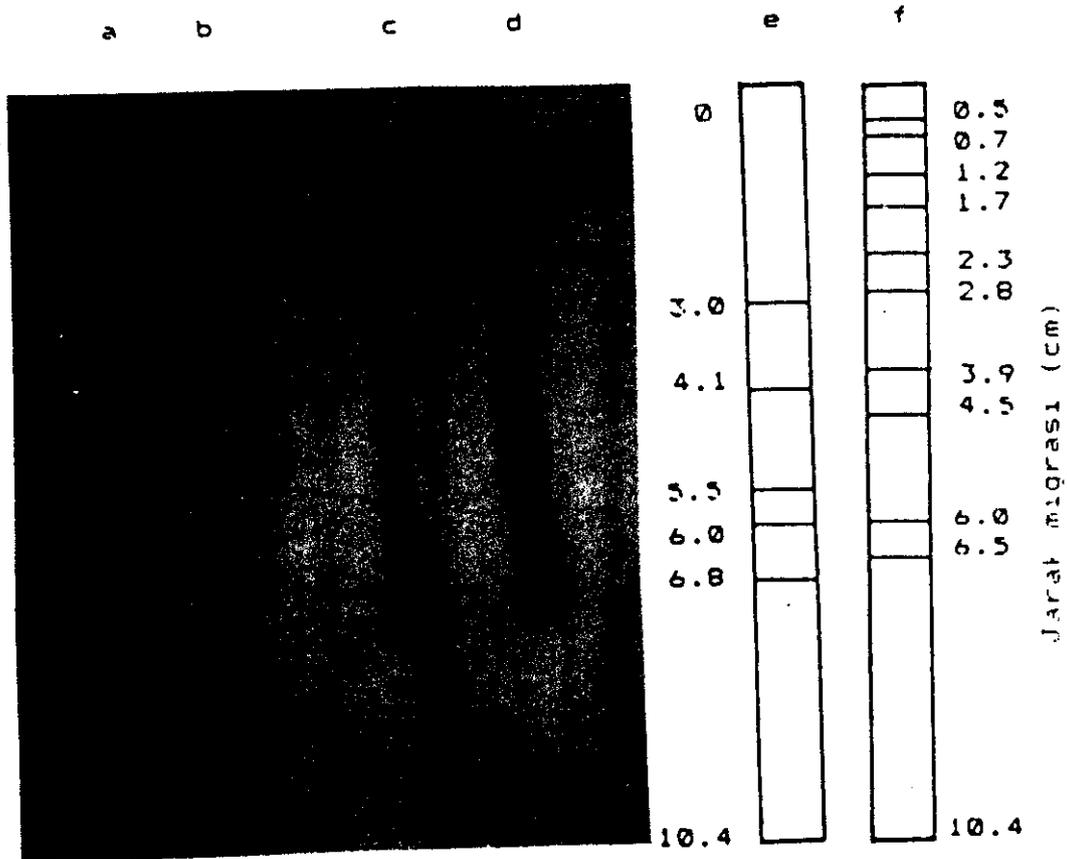
Hasil pewarnaan dengan metoda *Coomassie Blue* terhadap hasil elektroforesis dengan gel non SDS dapat dilihat pada Gambar 8.

Dari gambar tersebut terlihat bahwa hasil elektroforesis dialisat enzim protease menghasilkan 10 pita protein. Hasil elektroforesis ini menunjukkan bahwa enzim protease pada sampel enzim hasil dialisis belum merupakan enzim murni, karena masih mengandung protein-protein lain yang bukan enzim, misalnya saja yang berasal dari skim pada saat produksi enzim.

Berdasarkan jarak migrasi dari *molecular marker* non SDS dari SIGMA yang telah diketahui berat molekulnya, maka diperoleh kurva standar untuk penentuan berat molekul sampel seperti terlihat pada Gambar 9, sedang perhitungannya dapat dilihat pada Lampiran 3.

Dari perhitungan berdasarkan persamaan regresi linier dari kurva standar tersebut, diperoleh data berat molekul dari pita-pita protein yang dihasilkan, seperti terlihat pada Tabel 6.

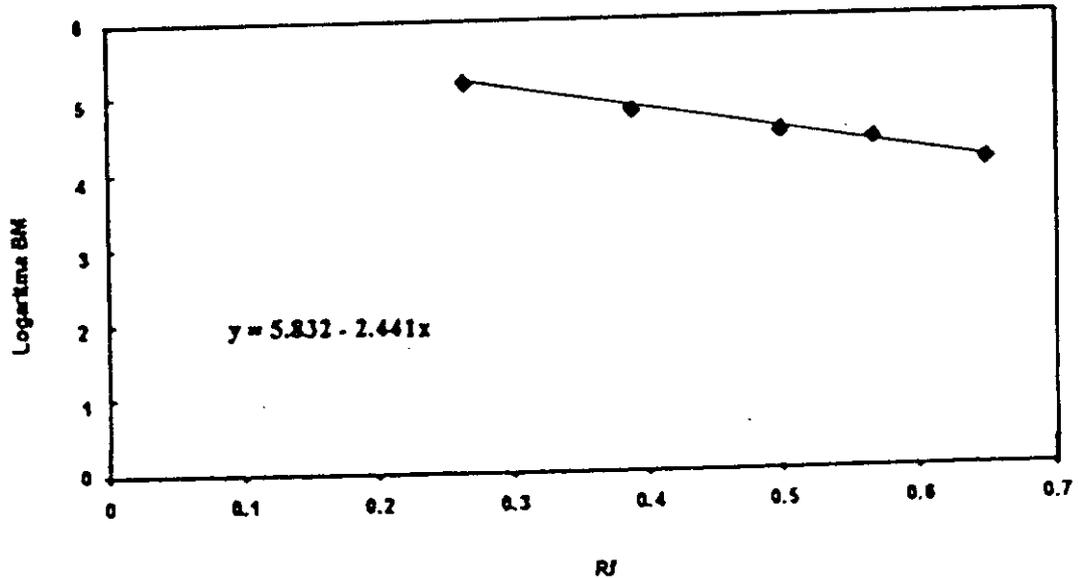




Keterangan: a dan b : migrasi marker non-SDS
 c dan d : migrasi sampel protease
B. pumilus (y1)
 e : perkiraan migrasi marker non-SDS
 f : perkiraan migrasi sampel protease
B. pumilus (y1)

Gambar 8. Hasil elektroforesis pada gel non SDS dan perkiraan jarak migrasinya.

Dari kesepuluh pita protein tersebut, selanjutnya perlu dianalisa pita protein mana yang merupakan enzim protease. Penentuan berat molekul enzim protease yang dihasilkan oleh *B. pumilus* (y1) dilakukan dengan teknik zimogram yang akan dibahas lebih lanjut.



Gambar 9. Kurva standar untuk penentuan berat molekul protein pada gel non SDS

C. ANALISIS BERAT MOLEKUL ENZIM PROTEASE *B. pumilus* (Y1) DENGAN TEKNIK ZIMOGRAM

Dalam penelitian ini akan dibandingkan tiga teknik analisis zimogram untuk memperoleh teknik yang dapat diandalkan untuk penentuan berat molekul enzim protease *B. pumilus* (y1). Ketiga metoda yang diteliti adalah *blotting* dengan gel agarosa yang mengandung substrat, metoda kopolimerisasi gel poliakrilamid

dengan substrat kasein, dan *blotting* dengan film X-Ray.

Prinsip dari teknik zimogram adalah reaksi spesifik antara enzim dengan substrat. Menurut Scopes (1987) teknik ini merupakan teknik pewarnaan spesifik, dimana gel yang digunakan untuk elektroforesis sampel yang akan digunakan untuk analisis zimogram terbatas pada gel non denaturasi, baik oleh SDS maupun urea, karena pada umumnya enzim akan kehilangan aktivitasnya jika terdenaturasi. Di samping itu, hasil elektroforesis juga tidak boleh difiksasi lebih dahulu sebelum digunakan untuk analisis zimogram, karena pereaksi untuk fiksasi akan berdifusi lebih dahulu ke sisi aktif enzim sebelum enzim berdifusi ke dalam gel.

Jumlah sampel yang disuntikkan ke gel elektroforesis dengan tujuan analisis zimogram membutuhkan jumlah sampel yang lebih besar daripada elektroforesis untuk pewarnaan biasa. Dalam teknik pewarnaan spesifik ini dibutuhkan aktivitas enzim yang cukup untuk dapat menghidrolisa substrat, sehingga hasil hidrolisis dapat dideteksi. Berdasarkan hasil penelitian ini, jumlah sampel yang disuntikkan adalah 60 μ g.

Tabel 6. Nilai mobilitas relatif dan berat molekul hasil elektroforesis pada gel non SDS

Protein	Nilai Rf a)	BM
<i>α-Lactalbumin</i>	0.654	14.200 Da
<i>Carbonic anhidrase</i>	0.577	29.000 Da
<i>Albumin egg</i>	0.529	45.000 Da
<i>Albumin Bovine monomer</i>	0.394	66.000 Da
<i>Albumin Bovine dimer</i>	0.288	132.000 Da
Protein 1	0.048	518.800 Da
Protein 2	0.067	465.500 Da
Protein 3	0.115	355.600 Da
Protein 4	0.163	271.600 Da
Protein 5	0.221	196.300 Da
Protein 6	0.269	149.600 Da
Protein 7	0.375	82.600 Da
Protein 8	0.433	59.600 Da
Protein 9	0.577	29.000 Da
Protein 10	0.625	20.200 Da

a) Nilai Rf merupakan rasio jarak migrasi pita protein sampel dengan jarak migrasi pewarna tanda



Terdapat berbagai golongan protease yang masing-masing mempunyai spesifitas yang berbeda terhadap substrat protein. Derajat hidrolisis substrat bergantung pada keadaan substrat, spesifitas enzim, dan kondisi lingkungan, yang meliputi keadaan pH, suhu, tekanan, kekuatan ion, polaritas larutan atau media reaksi, serta ada tidaknya logam atau senyawa kimia tertentu. Oleh karena itu, dalam analisis zimogram pertama-tama perlu diketahui jenis dan sifat-sifat enzim protease yang dihasilkan, sehingga dapat ditentukan jenis substrat dan kondisi lingkungan yang dapat diterapkan sehingga memungkinkan enzim tersebut menjalankan aktivitas katalitiknya.

B. pumilus menghasilkan dua jenis enzim protease, yaitu protease serin alkali dan protease logam netral (Ward, 1983). *B. pumilus* (y1) yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan enzim protease dengan pH optimum 9, sehingga diduga menghasilkan enzim protease jenis serin alkali (Wijaya et al., 1994). Protease serin alkali termasuk golongan endopeptidase, yang memotong substrat protein dari dalam dengan titik pemotongan pada sisi karboksil, dan spesifik terhadap residu asam amino aromatik atau hidrofobik seperti tirosin, fenilalanin, atau leusin. Protease serin

alkali bakteri yang telah banyak dipublikasikan adalah subtilisin, yang mempunyai susunan asam amino pada sisi aktifnya berturut-turut serin, histidin, dan asam aspartat (Ward, 1983). Mekanisme hidrolisis enzim protease *B. pumilus* (γ_1) diduga mirip dengan subtilisin, sehingga substrat dan kondisi yang diterapkan dalam penelitian ini disesuaikan dengan sifat-sifat protease serin alkali.

1. Analisis Zimogram dengan Metoda *Blotting* Gel Agarosa-Substrat

Metoda ini merupakan modifikasi dari teknik *blotting* protein atau dikenal dengan teknik *Western Blot*, yang prinsipnya adalah memindahkan pita protein dari gel akrilamid ke medium yang lebih stabil dan imobil seperti kertas nitroselulosa. Pada penelitian ini tidak digunakan kertas nitroselulosa, tetapi dengan gel agarosa yang mengandung substrat, dimana digunakan tiga jenis substrat, yaitu kasein, gelatin, dan hemoglobin.

Agarosa adalah polisakarida yang tersusun dari rantai polimer disakarida agarobiosa (D-galaktosa dan 3,6-anhidro-1-galaktosa) yang dapat membentuk struktur gel berpori yang sangat hidrofobik (Harris, 1989). Derajat ikatan silang dan jumlah

agarosa yang digunakan menentukan ukuran pori gel, dimana hal ini sangat mempengaruhi keberhasilan proses difusi dan pemindahan pita protein dari gel poliakrilamid ke gel agarosa, serta mempengaruhi kerja enzim dalam memecah substrat yang terimobilisasi di dalamnya. Dari hasil penelitian diperoleh konsentrasi agarosa yang memberikan hasil terbaik adalah 1.2% (w/v).

Peralatan *blotting* seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dalam metoda penelitian, berturut-turut dari bawah ke atas adalah kertas saring jenuh oleh buffer transfer, gel poliakrilamid, gel agarosa yang mengandung substrat, kertas saring, tissue, kertas merang, dan beban. Dengan susunan tersebut memungkinkan pita-pita protein hasil pemisahan elektroforesis pindah dari gel poliakrilamid ke gel agarosa yang mengandung substrat oleh adanya gaya difusi ke atas. Gaya difusi ini terjadi karena daya serap dari kertas saring, tissue, dan kertas merang yang diletakkan di atas gel agarosa, sehingga buffer transfer akan bergerak ke atas.

Proses transfer yang baik dapat diperoleh jika tidak terdapat gelembung udara diantara lapisan-lapisan tersebut, karena jika terdapat gelembung udara, otomatis proses transfer terganggu, yang

ditandai dengan tidak ratanya perpindahan buffer dari lapis ke lapis. Hal ini dapat menjadi sumber penyebab kegagalan, karena jika proses transfer kurang baik maka reaksi katalitik enzim protease terhadap substrat yang terimobilisasi di dalam gel kemungkinan juga terganggu, sehingga hasil hidrolisis tidak terdeteksi. Buffer transfer yang digunakan dalam teknik ini adalah buffer borat 0.05 M pH 8.0 yang ditambah dengan CaCl_2 12 mM, sama dengan buffer yang digunakan untuk uji aktivitas proteolitik dengan metoda Bergmeyer.

a. Substrat kasein

Menurut Suhartono (1992), kasein adalah protein yang menyusun 80% berat total protein susu sapi. Kasein merupakan grup heterogen dari fosfoprotein yang terdiri dari tiga komponen, yaitu alfa, beta, dan kapa-kasein dengan perbandingan 3 : 2 : 1 pada fase misel kasein. Penggunaan kasein untuk analisis aktivitas protease telah diterapkan dalam metoda Bergmeyer.

Hasil zimogram dengan menggunakan substrat kasein yang diimobilisasi dalam gel agarosa dapat dilihat pada Gambar 10. Kadar kasein yang

dapat memberikan hasil hidrolisis yang dapat dideteksi tersebut adalah sebesar 0.75% (w/v). Hasil hidrolisis ditandai dengan terbentuknya areal bening dengan latar belakang biru setelah diwarnai dengan metoda *Coomassie Blue*. Gel agarosa yang mula-mula keruh karena mengandung kasein, menjadi bening pada posisi enzim protease karena degradasi kasein oleh aktivitas katalitik enzim protease.

Hasil hidrolisis tersebut masih cenderung menyebar dan tidak membentuk pita. Berat molekul enzim protease diperkirakan dengan menghitung jarak dari titik awal ke tengah-tengah area bening hasil hidrolisis enzim protease, dan diasumsikan sebagai jarak migrasi enzim protease. Nilai tersebut dibandingkan dengan jarak migrasi pewarna tanda akan menghasilkan nilai mobilitas relatif 0.544, dan berdasarkan persamaan garis lurus kurva standar untuk penentuan berat molekul pada gel non-SDS (Gambar 9), diduga berat molekul enzim protease tersebut adalah 32.000 Da.

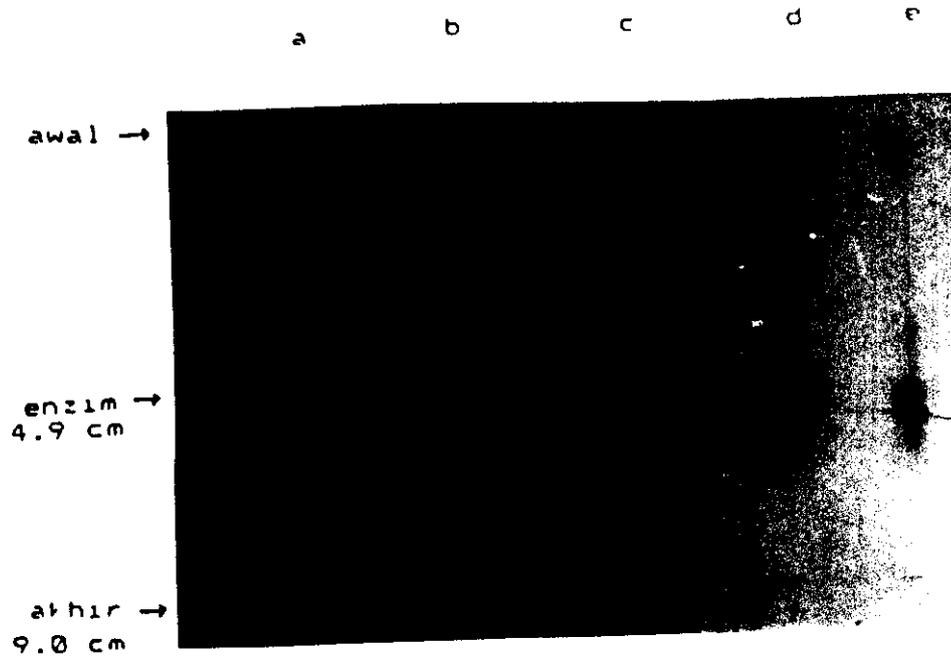
Hasil hidrolisis yang masih cenderung menyebar tersebut kemungkinan disebabkan oleh pengaruh gaya difusi yang bergerak tidak tegak

lurus, tetapi cenderung melebar. Hal ini sebenarnya dapat diatasi dengan mengurangi waktu transfer sehingga efek difusi tersebut dapat dihilangkan. Waktu transfer dapat dikurangi dengan menggunakan alat *electroblotting* yang memungkinkan proses transfer terjadi dalam 30 menit atau beberapa jam saja, atau dengan menghasilkan enzim protease dengan aktivitas katalitik yang sangat tinggi sehingga proses hidrolisis dapat berlangsung dalam waktu yang singkat. Hasil penelitian ini belum mendapatkan hasil yang optimum karena *B. pumilus* (y1) sangat mudah dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, sehingga aktivitas enzim yang dihasilkan sangat bervariasi, sehingga sulit untuk memperoleh enzim dengan aktivitas katalitik yang sangat tinggi.

b. Substrat gelatin dan hemoglobin

Gelatin tersusun dari tiga grup asam amino utama dengan komposisi sebagai berikut : seper-tiga bagian glisin atau alanin, seperempat bagian asam amino asam, dan seperempat bagian prolin atau hidroksi prolin. Gelatin, seperti

halnya kasein mengandung prolin dengan jumlah yang cukup banyak, sehingga tidak mudah terdenaturasi oleh panas (Charley, 1982).



Keterangan : a,b,c : hasil hidrolisis kasein
oleh enzim protease
B. pumilus (y1)
e,f : marker non-SDS

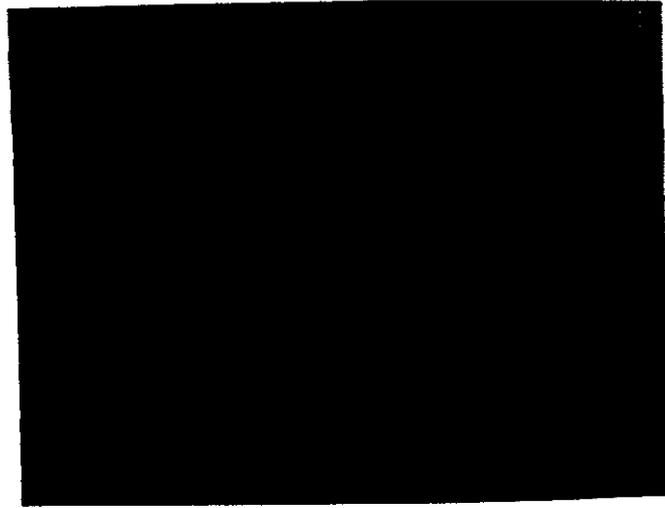
Gambar 10. Zimogram gel agarosa-kasein

Hemoglobin adalah protein berwarna merah yang berfungsi sebagai pembawa oksigen pada sel darah merah. Hemoglobin merupakan protein

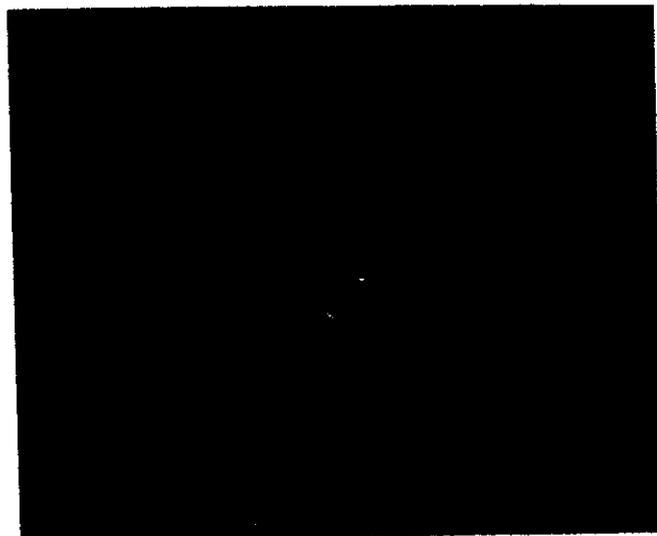
globular yang merupakan hemoprotein dengan empat cincin porfirin dan sebuah grup prostetik Heme dalam bentuk Fe^{2+} . Hemoglobin manusia terdiri dari 574 residu asam amino yang berinteraksi satu sama lain dengan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Wood et al., 1981).

Konsentrasi substrat, kondisi lingkungan, dan metoda yang sama dilakukan untuk substrat gelatin dan hemoglobin. Namun dengan kedua jenis substrat ini tidak diperoleh signal hasil hidrolisis yang diharapkan (Gambar 11 dan 12). Dengan substrat gelatin seharusnya diperoleh hasil yang sama dengan substrat kasein, yaitu areal bening dengan latar belakang biru setelah diwarnai dengan metoda *Coomassie Blue*, sedangkan dengan substrat hemoglobin hasil yang diharapkan adalah pita bening dengan latar belakang merah. Tidak terdeteksinya hasil hidrolisis enzim terhadap substrat gelatin dan hemoglobin ini kemungkinan karena proses transfer yang kurang sempurna sehingga pita protein tidak berpindah ke gel agarosa, sehingga tidak dapat menghidrolisis substrat yang terimobilisasi pada gel agarosa. Kemungkinan yang lain adalah enzim protease yang dihasilkan *B. pumilus* (y1) lebih

sensitif terhadap substrat kasein dibandingkan substrat gelatin dan hemoglobin yang terimobilisasi dalam gel agarosa.



Gambar 11. Zimogram gel agarosa- gelatin



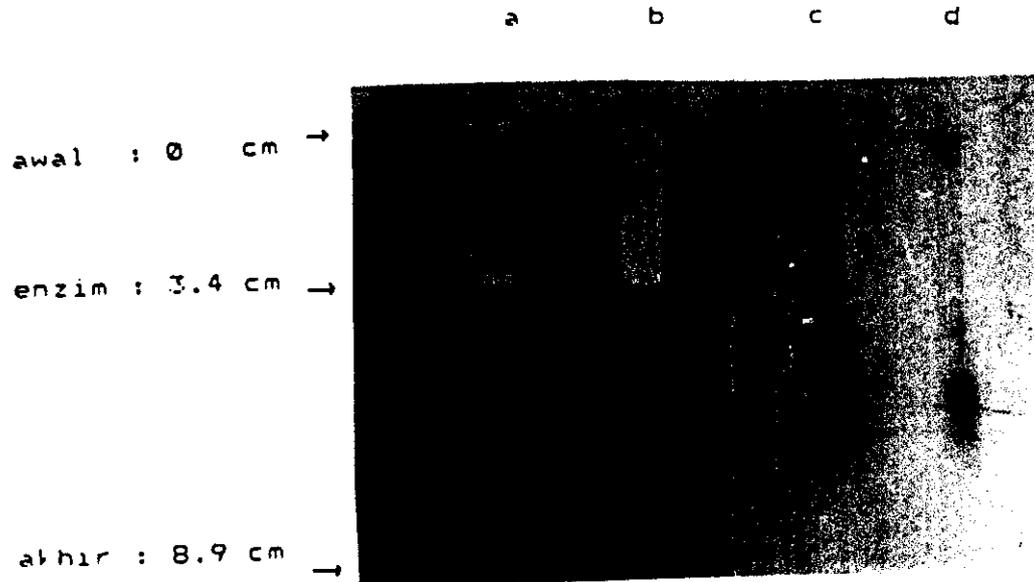
Gambar 12. Zimogram gel agarosa-hemoglobin

2. Analisis Zimogram dengan Metoda Kopolimerisasi Gel Poliakrilamid-Substrat Kasein

Pada metoda yang kedua ini substrat kasein dikopolimerisasikan dengan poliakrilamid dalam gel elektroforesis, dengan konsentrasi substrat kasein 0.2% (w/v). Setelah elektroforesis selesai, gel diperlakukan berturut-turut dengan 2.5% Triton X-100 dan 0.1 M glisin pH 8.3. Pita enzim protease diharapkan akan menghidrolisa substrat kasein dalam gel poliakrilamid dan membentuk pita bening dengan latar belakang biru setelah pewarnaan dengan metoda *Coomassie Blue*.

Dari hasil penelitian ini ternyata tidak dihasilkan pita bening, melainkan terbentuk areal bening dari awal pergerakan pita protease sampai suatu jarak tertentu. Dari hasil zimogram yang berupa areal bening ini diduga enzim protease telah bekerja menghidrolisis substrat kasein dalam pergerakannya selama proses elektroforesis.

Gambar 13 menunjukkan zimogram kopolimerisasi non SDS PAGE dengan kasein. Dari perbandingan jarak ujung areal bening yang terbentuk dan jarak migrasi pewarna diperoleh nilai mobilitas relatif dari enzim protease, yaitu sebesar 0.382. Berda-



Keterangan: a,b : hasil hidrolisis kasein oleh protease *B. pumilus* (y1)
e,f : marker non-SDS

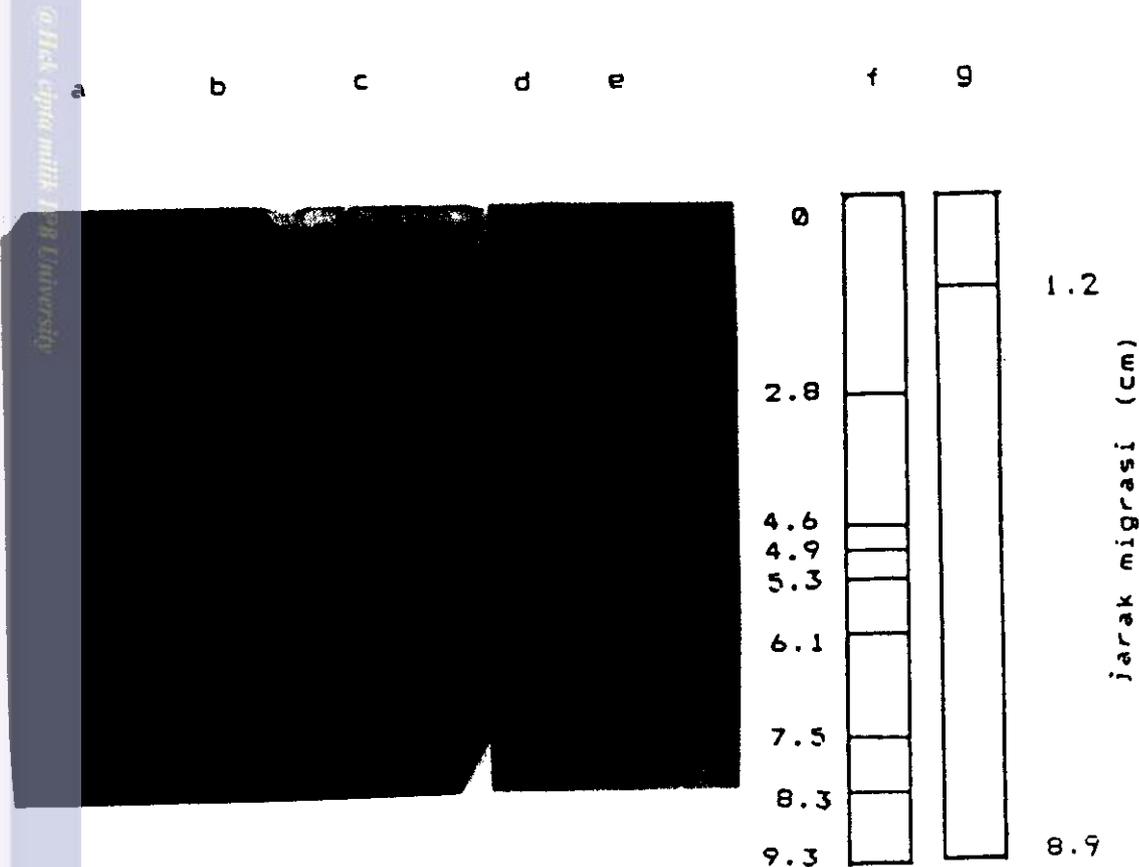
Gambar 13. Zimogram kopolimerisasi non-SDS PAGE-kasein

sarkan persamaan regresi linier kurva standar penentuan berat molekul pada gel non SDS (Gambar 9), diduga berat molekul enzim protease *B. pumilus* (y1) adalah 79.400 Da. Nilai ini jauh berbeda dari hasil penelitian Wijaya et al. (1994), dimana *B. pumilus* (y1) diduga menghasilkan dua jenis enzim protease dengan berat molekul 19.500 Da dan 30.000 Da. Hasil perhitungan berat molekul yang sangat

besar dengan metoda kopolimerisasi ini kemungkinan disebabkan oleh bekerjanya enzim selama elektroforesis, sehingga batas akhir areal bening yang terbentuk bukan merupakan posisi sesungguhnya dari pita protein yang mengandung enzim protease. Aktivitas enzim protease yang tidak begitu tinggi tidak mampu menghidrolisa substrat kasein yang ada sampai dengan mencapai jarak migrasi pita protease. Jadi, sebelum mencapai jarak migrasi yang seharusnya, pita protease telah kehilangan aktivitasnya, sehingga areal bening yang terbentuk lebih pendek daripada yang sesungguhnya.

Gambar 14 menunjukkan zimogram kopolimerisasi SDS PAGE dengan substrat kasein dan perbandingannya dengan *molecular marker* SDS untuk penentuan berat molekulnya. Jarak migrasi dari enzim protease pada gel SDS ini lebih pendek daripada gel non SDS. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh hilangnya sebagian aktivitas katalitik enzim protease akibat denaturasi oleh SDS.

Perbandingan jarak migrasi enzim dan jarak migrasi pewarna tanda memberikan nilai mobilitas relatif sebesar 0.135. Berdasarkan kurva standar *molecular marker* SDS pada Gambar 15, diduga berat

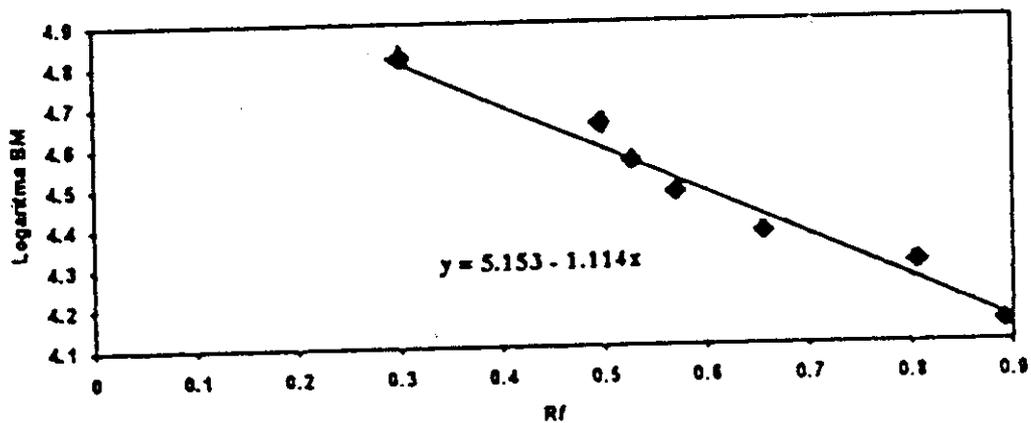


Keterangan : a,b,c : hasil hidrolisis kasein oleh protease *B. pumilus* (y1)
 d,e : marker SDS-PAGE
 f : perkiraan jarak migrasi marker SDS-PAGE
 g : perkiraan jarak migrasi protease *B. pumilus* (y1)

Gambar 14. Zimogram kopolimerisasi SDS PAGE-kasein dan perbandingannya dengan molecular marker SDS PAGE



molekul enzim protease adalah 100.600 Da. Nilai ini juga sangat jauh dengan hasil penelitian Wijaya et al (1994), sehingga metoda kopolimerisasi kurang tepat untuk penentuan berat molekul enzim protease *B. pumilus* (y1).



Gambar 15. Kurva standar untuk penentuan berat molekul pada gel SDS

3. Analisis Zimogram dengan Metoda Blotting Film X-Ray

Film X-Ray yang akan digunakan untuk analisis zimogram adalah film X-Ray yang sengaja diekspos ke cahaya, kemudian dicelup larutan developer (pengembang), dan dikeringudarkan. Prinsip dari zimogram

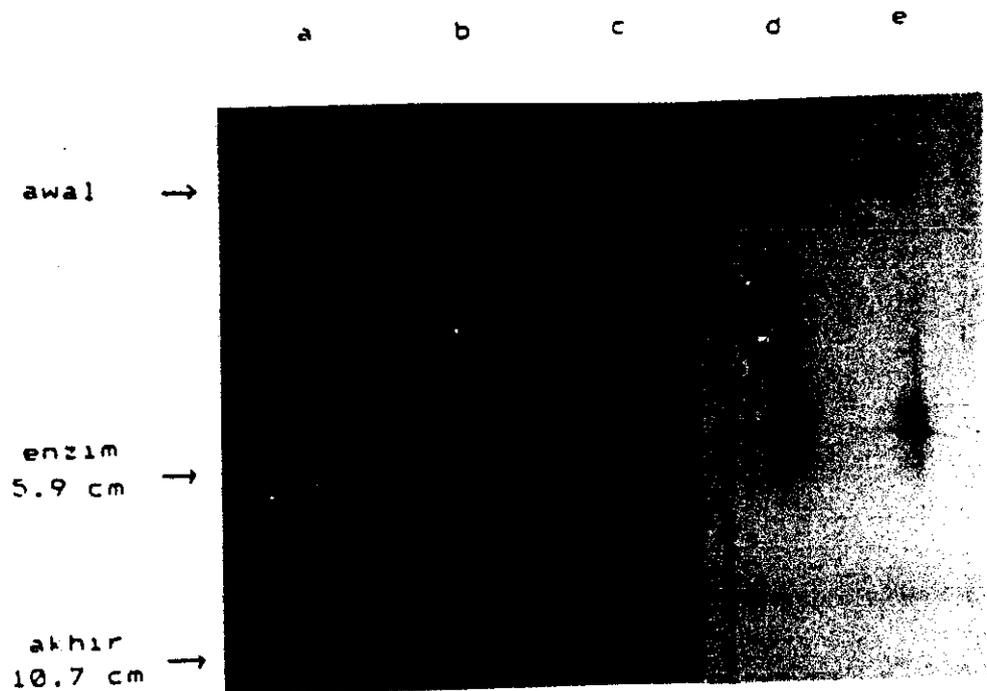
dengan metoda ini adalah hidrolisis enzim protease terhadap lapisan gelatin dari film yang berfungsi sebagai substrat. Hasil hidrolisis ditandai dengan pita bening dengan latar belakang hitam.

Penggunaan film yang telah diekspos ke cahaya didasarkan pada alasan-alasan sebagai berikut : komponen aktif berupa perak bromida dan komponen kimia lain pada film yang belum dicelup larutan developer dapat mengganggu aktivitas beberapa enzim protease sehingga hasil hidrolisis protease tidak terdeteksi, di samping itu, dengan film yang telah diekspos ke cahaya akan dihasilkan zona bening dengan latar belakang hitam yang relatif lebih kontras daripada latar belakang abu-abu atau kuning pada film yang belum dicelup larutan developer.

Sebelum proses *blotting* film X-Ray ke gel poliakrilamid yang berisi pita protein, film perlu dihidrasi dulu dengan akuades selama 1 jam. Tujuan tahap ini adalah untuk memudahkan proses transfer protease yang merupakan fungsi dari afinitas enzim-substrat dan kejenuhan permukaan transfer. Pada proses transfer ini protease akan terimobilisasi oleh substrat padat, dimana dalam penelitian ini proses *blotting* dilakukan selama semalam untuk menjamin keberhasilan proses transfer. Selanjutnya

film direndam di dalam buffer borat 0.05 M pH 8.0 yang mengandung 12 mM CaCl_2 dengan suhu 50°C yang merupakan suhu optimum aktivitas enzim protease *B. pumilus* (y1), dan diinkubasi pada suhu 37°C selama. Pada proses ini akan terjadi reaksi hidrolisis substrat gelatin, yang ditandai dengan terbentuknya areal bening. Agitasi harus dihindarkan pada tahap ini karena zona bening yang terbentuk akan menyebar, sehingga berat molekul tidak dapat ditentukan dengan tepat. Reaksi hidrolisis dapat dihentikan dengan merendam film dalam akuades, selanjutnya dikeringudarkan dan difoto sebagai data otentik. Hasil zimogram dengan film X-Ray ditunjukkan oleh Gambar 16.

Zona bening yang terlihat tersebut mempunyai nilai mobilitas relatif 0.552, dan berdasarkan kurva standar untuk penentuan berat molekul pada gel non-SDS (Gambar 9) diduga nilai berat molekul enzim protease *B. pumilus* (y1) adalah 30.500 Da. Nilai ini hampir sama dengan pita protein kesembilan yang dihasilkan dari pewarnaan *Coomassie Blue* yang mempunyai berat molekul 29.000 Da. Nilai ini juga mendekati protease kedua hasil penelitian Wijaya et al (1994), yang diduga mempunyai berat molekul 30.000 Da.

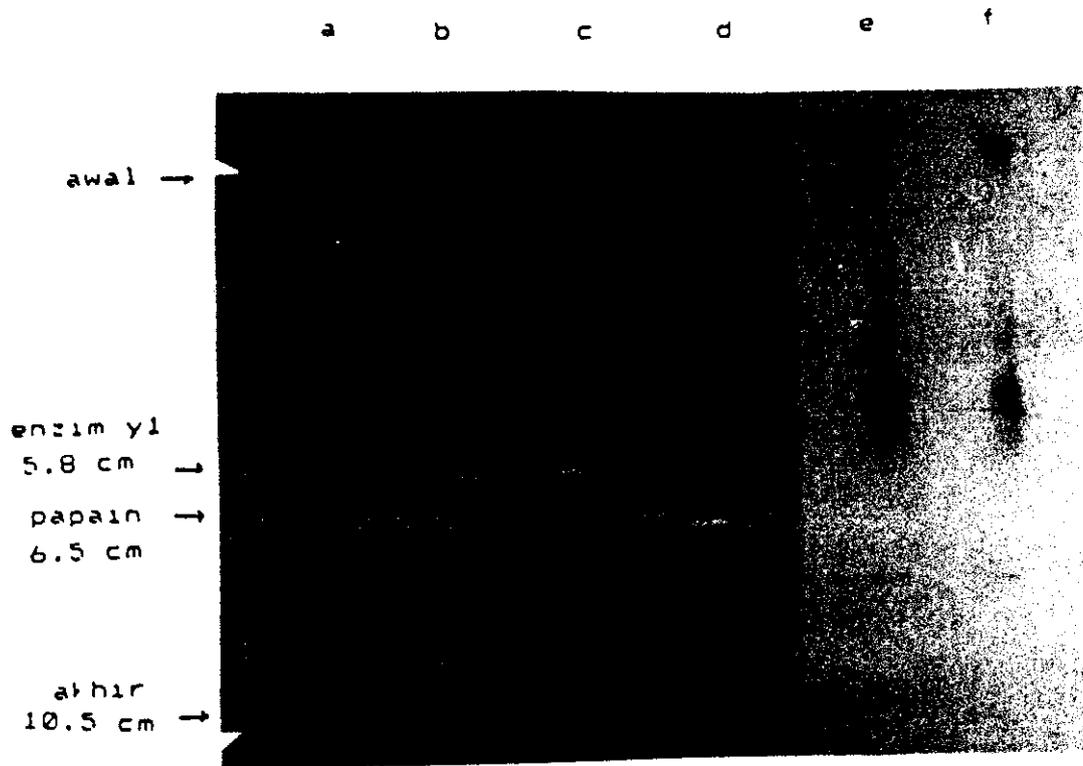


Keterangan: a,b,c : hasil hidrolisis lapisan gelatin film X-ray oleh enzim protease *B. pumilus* (y1)
d,e : marker non-SDS PAGE

Gambar 16. Zimogram film X-Ray

Metoda ini juga dicoba untuk mengetahui berat molekul dari protease standar papain. Papain adalah protease yang diperoleh dari getah tanaman pepaya, yang mempunyai berat molekul 21 kDa. Papain merupakan protease netral yang dapat digolongkan ke dalam protease sulfhidril, dengan asam amino sis-

tein, histidin, dan triptofan pada sisi aktifnya (Suhartono, 1992). Hasil zimogram film X-Ray dari protease *B. pumilus* dan kontrol papain ditunjukkan oleh Gambar 17.



Keterangan : a,b,c : hasil hidrolisis lapisan gelatin film X-ray oleh enzim protease *B. pumilus* (y1)
 d : hasil hidrolisis lapisan gelatin film X-ray oleh kontrol papain
 e,f : marker non-SDS PAGE

Gambar 17. Zimogram film X-Ray protease *B. pumilus* (y1) dan kontrol papain

Dari hasil zimogram pada Gambar 17 diperoleh nilai mobilitas relatif enzim papain adalah 0.619, yang setara dengan berat molekul 20.900 Da. Nilai ini mendekati nilai berat molekul dari pustaka (Suhartono, 1992), sehingga teknik zimogram dengan film x-Ray ini merupakan metoda penentuan berat molekul yang cocok untuk enzim protease, baik protease serin maupun protease sulfhidril. Keunggulan lain dari zimogram film X-Ray ini adalah sederhana dan sensitif, sehingga praktis diterapkan untuk keperluan analisa berat molekul enzim.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Bacillus pumilus (y1) yang diisolasi dari limbah cair tahu menghasilkan enzim protease yang termasuk protease serin alkali. Aktivitas ekstrak kasar enzim adalah 0.036 IU/ml, dan setelah pemurnian dengan pengendapan oleh amonium sulfat adalah 0.365 IU/ml. Aktivitas enzim setelah proses dialisis mengalami penurunan menjadi 0.106 IU/ml karena lepasnya kofaktor logam sehingga enzim kehilangan sebagian aktivitas katalitiknya. Namun aktivitasnya dapat ditingkatkan lagi menjadi 0.838 IU/ml setelah penambahan CaCl_2 6 mM dan disimpan selama satu minggu.

Hasil elektroforesis pada gel poliakrilamid non SDS setelah pewarnaan dengan metoda *Coomassie Blue* menghasilkan 10 pita protein dengan berat molekul 20.200 Da, 29.000 Da, 59.600 Da, 82.600 Da, 149.600 Da, 196.300 Da, 271.600 Da, 355.600 Da, 465.600 Da, dan 518.800 Da. Dari kesepuluh pita protein tersebut dapat ditentukan pita protein mana yang merupakan enzim protease melalui teknik zimogram.

Analisis zimogram dengan metoda *blotting non-SDS PAGE* pada gel agarosa-substrat memberikan hasil yang dapat dideteksi pada substrat kasein, namun masih

memberikan hasil hidrolisis berupa areal bening yang cenderung menyebar. Dari metoda ini diduga berat molekul enzim protease *B. pumilus* (y1) adalah 32.000 Da. Metoda *blotting* dengan gel agarosa yang mengandung substrat gelatin dan hemoglobin tidak memberikan hasil yang diharapkan.

Dari zimogram dengan metoda kopolimerisasi pada gel SDS diduga berat molekul enzim adalah 100.600 Da, dan pada gel non SDS 79.400 Da. Nilai tersebut tidak sesuai dengan hasil penelitian Wijaya et al (1994) dan Suhartono (1992).

Zimogram yang paling tepat untuk analisis berat molekul enzim protease *B. pumilus* adalah dengan metoda *blotting* film X-Ray pada gel non SDS, dimana diduga berat molekul enzim adalah 30.500 Da.

B. SARAN

Beberapa hal yang perlu dilaksanakan untuk menyempurnakan penelitian ini adalah :

1. Mengoptimalkan hasil zimogram gel agarosa-kasein dengan metoda *electroblotting*.
2. Mengoptimalkan hasil zimogram dengan metoda kopolimerisasi agar enzim protease tidak bekerja saat

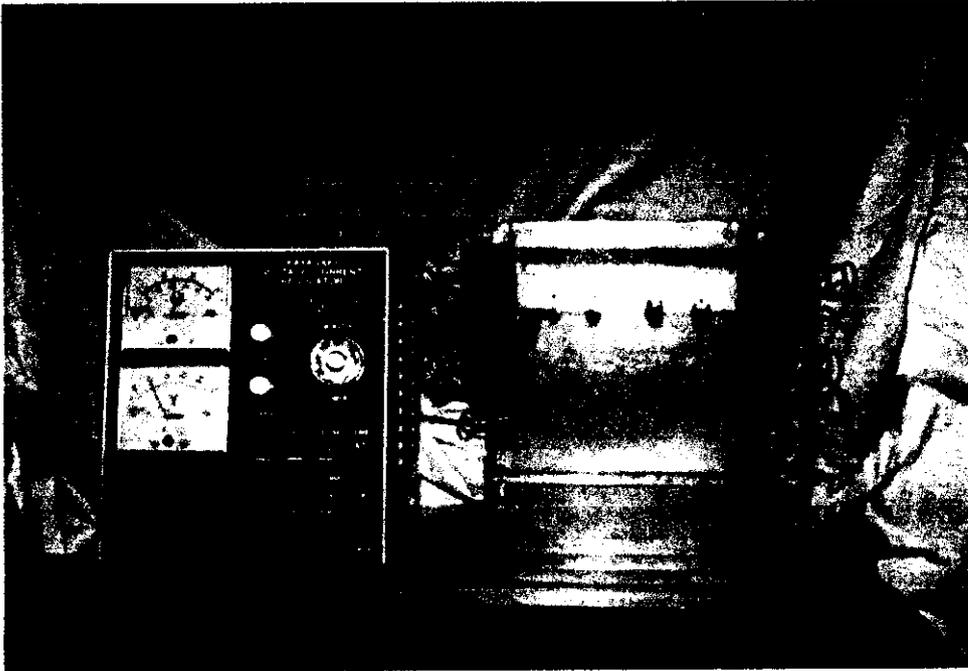
- Hanlon, G.W., dan N.A. Hodges. 1981. Bacitracin and Protease Production in Relation to Sporulation During Exponential Growth of *B. licheniformis* on Poorly Utilized Carbon and Nitrogen Sources. *J. Bact.* 162(2):427-431.
- Hames, B.D. dan D. Rickwood. 1987. Gel Electrophoresis of Proteins : a Practical Approach. IRL Press, Washington DC.
- Kawira, A. 1993. Produksi Protease *Bacillus pumilus* yang Diisolasi dari Limbah Cair Tahu dengan Fermentasi Terkontrol. Skripsi. Fateta, IPB, Bogor.
- Laemmli, U.K. 1990. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Likumahwa, M.Y.Y. 1993. Pencirian Bakteri Penghasil Protease yang Diisolasi dari Limbah Cair Tahu dengan Bantuan Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Skripsi. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. FATETA-IPB, Bogor.
- Lucas, N., Mazaurd-Aujard, C., Bremaud, L., Cenatiempo, Y., dan Julien, R. 1994. Protein purification gene cloning and sequencing of an acidic endoprotease from *Myxococcus xanthus* DK 101. *Anal. Biochem.* 222 : 247-254.
- Margesin, R., N. Palma, F. Knauseder and F. Schinner. 1992. Purification and characterization of alkaline-serine protease produced by psychrotropic *Bacillus* sp.. *J. Biotech.* 24 : 203-206.
- Maurer, R.H. 1974. Polyacrylamide Gel Electrophoresis : Theory and Practise of Optimization and Standardization. Di dalam Allen, R.C. dan H.R. Maurer (eds). *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel.* Walter de Gruyter, New York.
- Mayes, P.A., D.K. Granner, V.W. Rodwell, dan D.W.Martin. 1987. Biokimia. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Milton, D.L., A.N. Norovist, dan H.W. Watz. 1992. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bact.* 174 (22) : 7235 - 7244.

- Morris, C.J.O.R. dan P. Morris. 1976. Separation Method in Biochemistry. Pitman Publishing, London.
- Nur, M.A. dan H. Adijuwana. 1988. Teknik Separasi dalam Analisis Pangan. PAU IPB, Bogor.
- Paech, C., T. Christianson, dan K.H. Maurer. (1993). Zymogram of proteases made with developed film from nondenaturing polyacrylamide gels after electrophoresis. Anal. Biochem. 208 : 249-254.
- Pomeranz, Y. dan C.L. Meloan. 1980. Food Analysis : Theory and Practise. AVI Pub. Co., Inc., Westport, Connecticut.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzymes syntesis in the genus *Bacillus*. Bact. Rev. 41(3):711-753.
- Scopes, R.K. 1987. Protein Purification. R.R. Donnelley and Sons, USA.
- Smith, B.J. 1984. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Protein. Di dalam Walker, J.M. (ed.). Proteins : Methods in Molecular Biology, vol 1. The Humana Press Inc., USA.
- Suhartono, M.T. 1992. Protease. PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Tal, M., A. Silberstein, dan E. Nusser. 1980. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins. J. Biol. Chem. 260 (18) : 9976-9980.
- Ward, O.P. 1983. Proteinases. Di dalam Fogarty, W.M. Microbial Enzyme and Biotechnology. Applied Science Publisher, New York.
- Wijaya, I.P.N., M.T. Suhartono, D. Mangunwidjaja, dan F.G. Winarno. 1994. Pemurnian dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus pumilus*. Di dalam Prosiding Seminar Pertemuan Ilmiah Tahunan PERMI 10 Desember 1994. Bogor.

Wong, H. 1995. Mempelajari Pengaruh Senyawa Kimiawi Terhadap Stabilitas Protease *Bacillus pumilus* y1 Selama Penyimpanan. Skripsi. Fateta, IPB, Bogor.

Wood, W.B., J.H. Wilson, R.M. Benbow, dan L.E. Hood. 1981. Biochemistry - A Problem Approach. The Benjamin / Cumming Publishing Co., California.

Lampiran 1. Alat elektroforesis

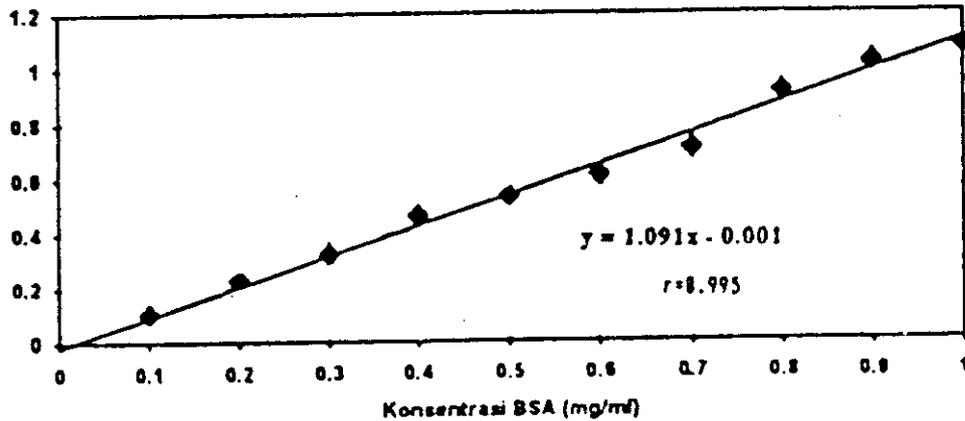


© Hak cipta milik IPB University

IPB University

Lampiran 2. Kurva standar larutan baku Bovine Serum Albumin

Absorbansi pada 578 nm



BSA (mg/ml)	A_{sp}	$A_{sp} - A_{bl}$
0.1	0.754	0.107
0.2	0.878	0.231
0.3	0.971	0.324
0.4	1.112	0.465
0.5	1.183	0.536
0.6	1.258	0.611
0.7	1.356	0.709
0.8	1.560	0.913
0.9	1.665	1.018
1.0	1.725	1.078

Keterangan : $A_{bl} = 0.647$

Kurva standar : BSA (mg/ml) = sumbu x

$A_{sp} - A_{bl}$ = sumbu y

Lampiran 3. Data hubungan konsentrasi amonium sulfat dan konsentrasi protein filtrat

Konsentrasi amonium sulfat (%)	A_{sp} a)	$A_{sp} - A_{bl}$ b)	Konsentrasi protein (mg/ml) c)
20	0.803	0.156	0.144
30	0.799	0.152	0.140
40	0.764	0.117	0.108
50	0.696	0.049	0.046
55	0.658	0.011	0.011
60	0.667	0.020	0.019
70	0.685	0.038	0.036

- a) Absorbansi sampel
 b) Absorbansi sampel - Absorbansi blanko
 dimana Absorbansi blanko = 0.647
 c) Konsentrasi protein diperoleh dengan memasukkan nilai b) ke persamaan pada Lampiran 2

Lampiran 4. Data uji Bergmeyer dan Bradford

1. Uji Bergmeyer

Enzim	A_{sp} a)	A_{std} b)	A_{bl} c)	Aktivitas (IU/ml)
Ekstrak kasar	0.126	0.532	0.100	0.036
Pengendapan	0.514	0.715	0.201	0.365
Dialisat	0.380	0.749	0.301	0.106
+CaCl ₂	0.877	0.710	0.289	0.838

- a) Absorbansi sampel
 b) Absorbansi standar
 c) Absorbansi blanko

2. Uji Bradford

Enzim	A_{sp} a)	$A_{sp} - A_{bl}$ b)	Konsentrasi protein (mg/ml)
Ekstrak kasar	1.048	0.401	0.37
Pengendapan	2.044	1.397	1.29
Dialisat	2.129	1.482	1.36
+CaCl ₂	2.129	1.482	1.36

- a) Absorbansi sampel
 b) Absorbansi sampel - Absorbansi blanko
 dimana Absorbansi blanko = 0.647

3. Uji Aktivitas spesifik

Enzim	Aktivitas spesifik (IU/mg) a)
Ekstrak kasar	0.097
Pengendapan	0.283
Dialisat	0.078
+CaCl ₂	0.616

- a) Aktivitas spesifik = (Aktivitas / Konsentrasi protein)

Lampiran 5. Data elektroforesis pada non-SDS PAGE

MOLECULAR MARKER	JM (cm)	BM(Da)	Rf	Log BM
α -Lactalbumin	6.8	14.200	0.654	4.15
Carbonic Anhidrase	6.0	29.000	0.577	4.46
Albumin Egg	5.5	45.000	0.529	4.65
Albumin Bovine monomer	4.1	66.000	0.394	4.82
Albumin Bovine dimer	3.0	132.000	0.288	5.12
SAMPEL				
Protein 1	0.5	518.000	0.048	5.71
2	0.7	465.500	0.067	5.67
3	1.2	355.600	0.115	5.55
4	1.7	271.600	0.163	5.43
5	2.3	196.300	0.221	5.29
6	2.8	149.600	0.269	5.18
7	3.9	82.600	0.375	4.92
8	4.5	59.600	0.433	4.78
9	6.0	29.000	0.577	4.42
10	6.5	20.200	0.625	4.31

Keterangan : JM pewarna = 10.4 cm
 JM : jarak migrasi
 BM : berat molekul
 Rf : (JM sampel / JM pewarna)
 Kurva standar : Rf = sumbu x
 log BM = sumbu y

Lampiran 6. Data kurva standar SDS Molecular Marker

Molecular Marker	JM (cm)	BM (Da)	Rf	log BM
<i>α</i> -Lactalbumin	8.3	14.200	0.892	4.15
Tripsin inhibitor	7.5	21.100	0.806	4.30
Tripsinogen	6.1	24.000	0.656	4.38
Carbonic anhidrase	5.3	29.000	0.570	4.48
Gliseraldehid 3P dehidrogenase	4.9	36.000	0.527	4.56
Albumin egg	4.6	45.000	0.495	4.65
Albumin bovine	2.8	66.000	0.301	4.82

Keterangan : JM pewarna = 9.3 cm

JM : jarak migrasi

BM : berat molekul

Rf : (JM sampel / JM pewarna tanda)

Kurva standar : Rf = sumbu x

log BM = sumbu y

Lampiran 7. Elektroforesis gel poliakrilamid
(Hames dan Rickwood, 1987)

I. Larutan Stok

1. Stok Akrilamid-bisakrilamid (30 : 0.8)

300 g akrilamid + 8 g N,N' metilen bisakrilamid dalam 1 liter akuades. Simpan pada botol gelap pada suhu 4°C. HATI-HATI ! Larutan akrilamid bersifat neurotoksik.

2. *Stacking gel* buffer stok (0.5 M Tris-HCl pH 6.8)

6.0 g Tris + 40 ml air, titrasi dengan HCl 1 M sampai dengan pH-nya 6.8, kemudian ditambah akuades sampai dengan volume 100 ml. Saring dengan kertas saring Whatman no.1.

3. *Resolving gel* buffer stok (3.0 M Tris-HCl pH 8.8)

36.3 g Tris + 48 ml HCl 1 M dan ditambah akuades sampai dengan volume 100 ml. Saring dengan kertas saring Whatman no.1.

4. Buffer Reservoir

SDS : 30.3 g Tris + 144.0 g Glisin + 10.0 g SDS, ditambah akuades sampai dengan volume 1 liter. pH ditepatkan sehingga mencapai pH 8.3. Sebanyak 100 ml larutan stok ini diencerkan menjadi 1 liter dengan akuades.

Non-SDS : sama, tetapi tanpa SDS

Lampiran 7 (lanjutan)

5. Katalis amonium persulfat 1.5%

0.15 g amonium persulfat dalam 10 ml akuades.

Larutan ini harus digunakan dalam keadaan segar.

6. Larutan SDS 10%

1 g SDS dalam 10 ml akuades.

II. Pembuatan Gel Poliakrilamid

1. Non SDS PAGE konsentrasi 7.5%

	<i>Stacking gel</i>		<i>Resolving gel</i>	
Akrlamid-bisakrlamid	2.5	ml	7.5	ml
Gel buffer	5.0	ml	3.75	ml
Amonium persulfat	2.5	ml	1.5	ml
Akuades	10.0	ml	17.25	ml
TEMED	0.015	ml	0.015	ml

2. SDS PAGE konsentrasi 7.5%

	<i>Stacking gel</i>		<i>Resolving gel</i>	
Akrlamid-bisakrlamid	2.5	ml	7.5	ml
Gel buffer	5.0	ml	3.75	ml
SDS	0.2	ml	0.3	ml
Amonium persulfat	1.0	ml	1.5	ml
Akuades	11.3	ml	19.45	ml
TEMED	0.015	ml	0.015	ml

