

MEMPELAJARI PENGARUH LINGKUNGAN KIMIWI TERHADAP AKTIVITAS DAN DAYA TAHAN PANAS PROTEASE DARI *Bacillus pumilus* Y1

(STUDY ON THE EFFECTS OF CHEMICAL ENVIRONMENTS TOWARD STABILITY AND ACTIVITY OF PROTEASE FROM *Bacillus pumillus* Y1)

Budiatman Satlawihardja¹⁾, Maggy T. Suhartono¹⁾ dan
Agus Kusdinar²⁾

ABSTRACT

*Proteases from Bacillus pumillus Y1 produced in the medium of liquid tofu waste an-
riched with 5% skim milk, had optimum conditions at pH 8, temperature of 37°C and sensi-
tive to PMSF and EDTA.*

*The protease activity can be increased with addition chemicals, namely NaCl 2 mM
(0.373 U/ml or 117.11%), CoCl₂ 6 mM (0.412 U/ml or 131.46 %), Tween 5% (0.576 U/ml or
1007.69%), butanol 15% (0.373 U/ml or 150.34 %), and sorbitol 15% (0.689 U/ml or 720.24
%). With the addition of these chemicals of incubation temperature 55°C, protease activity
was still detected until 50 minutes. Exception occurred with the addition of Tween 5% in
which protease activity was still observed after 60 minutes incubation (0.051 U/ml, whereas
at the incubation temperature of 90 °C the protease activity was detected until 50 minutes
(0.011 U/ml). With the control at incubation temperature of 55°C and 90°C protease activity
was still detected after 40 and 30 minutes incubation.*

PENDAHULUAN

Protease mikroba merupakan enzim komersial yang dapat mengkatalisis hidrolisis pemecahan protein. Peranan protease baik untuk industri pangan maupun non pangan telah banyak dirasakan dan terus dikembangkan. Bila dibandingkan dengan protease-protease yang dihasilkan dari hewan dan tumbuhan, protease mikroba mempunyai banyak kelebihan. Kelebihan tersebut diantaranya: dapat diproduksi dalam jumlah besar, produktivitasnya dapat ditingkatkan (Standbury dan Whitsker, 1984), mutunya lebih seragam dan harganya murah karena mikroba dapat tumbuh pada media yang disusun dari limbah pertanian.

Salah satu mikroba penghasil protease adalah *Bacillus pumilus* Y1 yang telah diisolasi dari limbah cair tahu dan telah dilakukan pencirian dengan bantuan *Pulsed Field Gel Electrophoresis* oleh Likumahwa (1993). Priest (1997) menyatakan bahwa pada umumnya protease dari *Bacillus* terdiri dari enzim serin, metal dan enzim hibrid dengan karakteristik gabungan antara protease metal dan serin. Protease disebut protease serin bila pada sisi aktifnya terdapat asam amino serin dan protease metal keaktifannya tergantung pada keberadaan logamnya (Moriyama, 1974). Yamato (1975) menambahkan bahwa EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) merupakan senyawa penghambat bagi enzim golongan protease logam. Selain EDTA juga Hg, sianida, dan Pb merupakan penghambat aktivitas protease logam.

Aktivitas enzim berhubungan langsung dengan perubahan struktur tertier dari dari

¹⁾ Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta-IPB,
Kotak Pos 220, Kampus Darmaga, Bogor 16002

²⁾ Alumni Jurusan teknologi Pangan dan Gizi, FATETA-
IPB, Bogor

molekul protein enzim. Pada keadaan suhu, pH, dan konsentrasi ion normal, struktur tertier protein distabilkan oleh empat jenis interaksi. Interaksi tersebut adalah ikatan hidrogen, gaya tarik ionik, dan jembatan kovalen (Mosan dan Combess, 1984). Berbagai cara dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas dan aktivitas enzim, salah satunya adalah penambahan aditif. Pengaruh senyawa aditif ini terbatas pada interaksi non kovalen dengan enzim atau pada sistem pelarut enzim.

Schwimer (1981) menggolongkan aditif menjadi beberapa kelompok diantaranya senyawa hidropilik (termasuk didalamnya alkohol polihidrat dan beberapa gula); larutan garam dan gula, ion logam, senyawa pengkelat, senyawa produksi, dan antioksidan. Senyawa hidropilik sesuai dengan sifatnya bila ditambahkan kedalam larutan enzim dapat menurunkan aktivitas air. Dengan demikian interaksi hidrofobik antara residu asam amino non polar pada molekul protein enzim semakin kuat, sehingga struktur protein enzim lebih stabil (Wiramargana, 1992). Garam dan gula berperan dalam mencegah denaturasi enzim. Daya stabilitas ion logam terhadap protease bervariasi tergantung dari logam yang bersangkutan. Menurut Schwimer (1981) ion Mn^{2+} dapat menstabilkan lisozim dan ion Co^{2+} telah mendapat paten untuk melindungi L-arginase selama pemurnian dan penyimpanan.

Senyawa pengkelat dapat pula menstabilkan enzim, hal ini disebabkan senyawa pengkelat dapat mengikat logam berat yang mengganggu disamping dapat mencegah interaksi enzim dengan asam atau golongan -SH (Schwimer, 1981). Konformasi aktif enzim dipertahankan oleh jembatan disulfida, ikatan disulfida ini dapat mengalami kerusakan oleh oksidasi. Dengan demikian mengurangi terjadinya peristiwa tersebut perlu ditambahkan senyawa pereduksi dan pengoksidasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari lingkungan kimiawi terhadap aktivitas dan gaya tahan panas protease dari *Bacillus pumilus* Y1.

METODOLOGI

Mikroba yang digunakan.

Mikroorganisme penghasil protease yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus pumilus* Y1 yang diisolasi dari limbah cair tahu oleh Likumahwa (1993).

Media

Media yang digunakan adalah media untuk perbanyakan dan pemeliharaan mikroba (Luria broth, Luria agar), serta media untuk fermentasi (Limbah Cair Tahu, dan susu skim).

Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan meliputi: NH_4OH , HCl, asam borat, boraks, kasein, $CaAl_2$, tirosin, TCA, Na_2CO_3 , pereaksi fenol, NaCl, NaOH, glukosa; KCN, $KMnO_4$, $Na_2S_2O_5$; KCl, NaCl, LiCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $PbCl_2$, AgCl, $CuCl_2$; metanol, etanol, butanol, propanol, heksanol, merkaptotanol, gliserol, sorbitol, politelenglikol; Tween, tripoliphosphat, SDS; PMSF beserta pelarutnya (Formamide), Na-EDTA, dan air laut (dari Ancol, Jakarta)

Alat

Alat-alat yang diperlukan untuk penelitian ini adalah meliputi alat-alat gelas, pembakar spiritus, jarum ose, pipet tetes, kapas, aluminium foil, rak tabung reaksi, botol semprot, ujung pipet mikro (tip), sentrifuse Beckmen GPR, spektrofotometer model spektronik 20, inkubator goyang grant SS40-A2, stirer magnetik, vortex Genie-2, lab-line 3550-1, pH meter Beckmen GPR, lemari es, oven, otoklaf, penjepit.

Penyiapan kultur dan inokulum

Penyiapan kultur dilakukan dengan mengambil sebanyak satu ose bakteri dalam agar miring secara aseptis, lalu digores pada agar miring LA kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam dan disimpan sebagai kultur stok. Pembuatan inokulum dilakukan dengan pengenceran kultur bakteri yang terdapat dalam kultur stok dengan 5 ml air steril. Kultur stok yang sudah diencerkan tersebut dimasukkan kedalam 50 ml media pertumbuhan yang sudah steril (limbah cair tahu yang diperkaya dengan susu skim 5%), dan diinkubasi pada inkubator bergoyang selama 10 jam pada suhu $37^\circ C$ dengan kecepatan putaran 200 rpm.

Produksi protease

Media yang digunakan untuk produksi protease pada penelitian ini limbah cair tahu ini adalah limbah csir tahu (LCT) yang ditambah dengan 5% skim dan pH dibuat 7. Setelah media dimasukkan kedalam elenmeyer sebanyak 90 ml kemudian disterisasi. Setelah dingin dimasukkan inokulum sebanyak 100% (v/v), fermentasi dilakukan selama 12 jam.

Tiap dua jam sekali diamati perubahan pH untuk dipertahankan sebesar 7.

Penentuan suhu dan pH optimum

Enzim yang dihasilkan dianalisa aktivitasnya pada suhu 27, 37, 55, 65, 75, dan 90 °C. Aktivitas tertinggi menunjukkan suhu optimum untuk enzim ini. Penentuan pH optimum dilakukan pada suhu optimum, enzim yang dihasilkan dianalisis aktivitasnya pada berbagai pH (6, 7, 8, 9, 10, 11 dan 12) dengan buffer universal. Kondisi pH yang memberikan aktivitas tertinggi menunjukkan pH optimum.

Pengaruh lingkungan kimiawi

Sebagian filtrat enzim ditambah dengan bahan-bahan kimiawi (sebagai sampel) dan sebagian lagi tanpa penambahan bahan kimiawi (sebagai kontrol). Bahan kimia yang digunakan untuk lingkungan kimiawi adalah logam monovalen (NaCl, KCl, LiCl), logam divalen (CoCl₂, MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, dan ZnCl₂), logam berat (mgCl₂, PbCl₂, dan AgCl), senyawa pereduksi dan pengoksidasi (KCN, KMnO₄, K₂S₂O₅, dan Na₂S₂O₅), detergen (SDS, TPP dan Tween), alkohol monohidrat (metanol, butanol, propanol), alkohol polihidrat (Sorbitol, gliserol, merkapto-etanol dan PEG), serta bahan kimia lain (PMSF, EDTA dan air laut). Kontrol digunakan sebagai pembandingan untuk mengetahui ada atau tidak pengaruhnya terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1

Penentuan daya tahan panas

Bahan kimiawi yang digunakan adalah bahan yang paling efektif dalam meningkatkan aktivitas protease. Sebelumnya filtrat enzim ditambah dengan kimiawi kemudian diinkubasi pada suhu 55 dan 90°C, 10 sampai 60 menit, kemudian diuji aktivitasnya.

Analisis aktivitas protease ditentukan berdasarkan metode Bergmeyer (1983). Satu unit protease dinyatakan sebagai sebagai satu umol yang dibebaskan per menit (aktivitas absolut). Aktivitas relatif adalah aktivitas hasil perlakuan dibandingkan terhadap kontrol yang dinyatakan sebagai 100%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Filtrat enzim yang diperoleh sebagian untuk analisa dan sebagian lagi disimpan pada refrigerator (suhu 2-4°C) sebagai cadangan. Enzim yang digunakan untuk analisa diganti

tiap tujuh hari sebab aktivitas enzim akan turun sejalan dengan waktu.

Penentuan Suhu dan pH optimum

Penentuan suhu optimum protease *Bacillus pumilus* Y1. pada penelitian ini akan dilakukan dengan cara mengukur aktivitasnya pada suhu inkubasi 27,37,55,65,75,dan 90°C. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa suhu 37°C merupakan suhu optimum,dengan unit aktivitassebesar 0,187 U/ml (Gambar 1a). Penentuan pH optimum dilakukan dengan menggunakan buffer universal. Nilai pH yang diujikan mulai dari pH 6 sampai 12. Gambar 1b memperlihatkan bahwa pH 8 merupakan pH optimum untuk dengan aktivitas yang dihasilkan sebesar 0,527 U/ml.

Peningkatan aktivitas enzim pada pH yang optimum dihubungkan dengan adanya perubahan ionisasi dalam gugus ionik enzim-enzim pada sisi aktifnya atau pada sisi lainnya yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif, sehingga konformasi sisi aktif menjadi efektif dalam mengikat dan mengubah substrat menjadi produk. Perubahan ionisasi dapat terjadi pada gugus enzim-substrat, yang berpengaruh pula terhadap aktivitas enzim (Webb dan Dixon,1979).

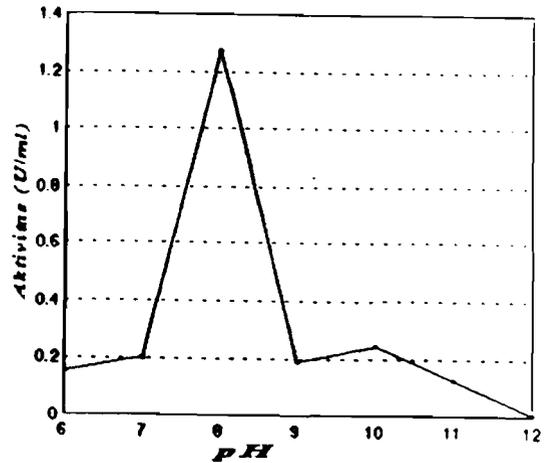
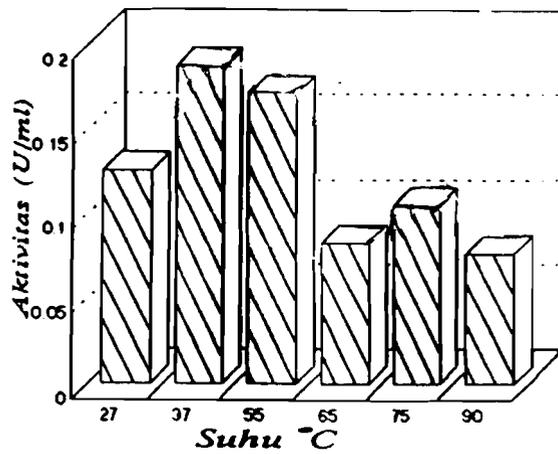
Pengaruh Logam Monovalen

Logam yang digunakan terdiri dari NaCl, KCl,dan LiCl pada kosentrasi 2 dan 10 mM. Penambahan NaCl 2 mM ternyata dapat meningkatkan aktivitas sebesar 0,373 U/ml atau 217,33% relatif terhadap kontrol, lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 2.

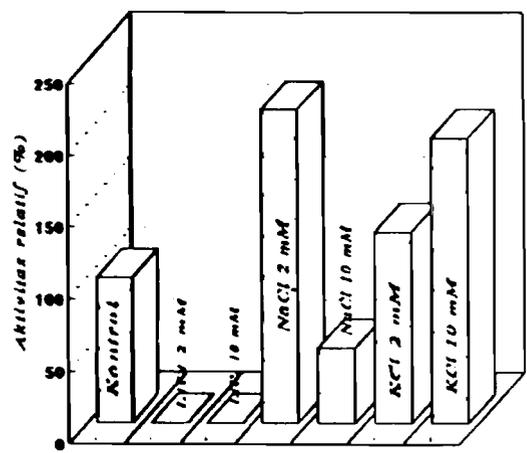
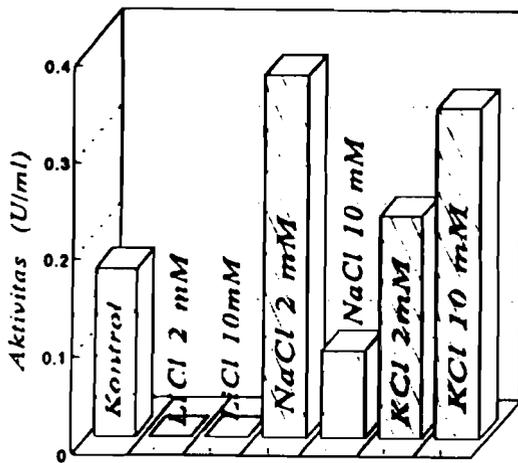
Pengaruh Logam Divalen

Ion logam berpengaruh terhadap aktivitas protease terutama protease logam. Ion-ion logam yang ditambahkan dalam bentuk garam-garam organik menurut Monsan dan Combess (1984) dapat memberikan kestabilan enzim dengan cara menetralkan muatan elektrostatik yang melindungi molekul enzim sehingga konformasi dapat dipertahankan. Seperti tampak pada Gambar 3 semua logam divalen yang ditambahkan mempunyai kecenderungan untuk menaikkan aktivitas protease.

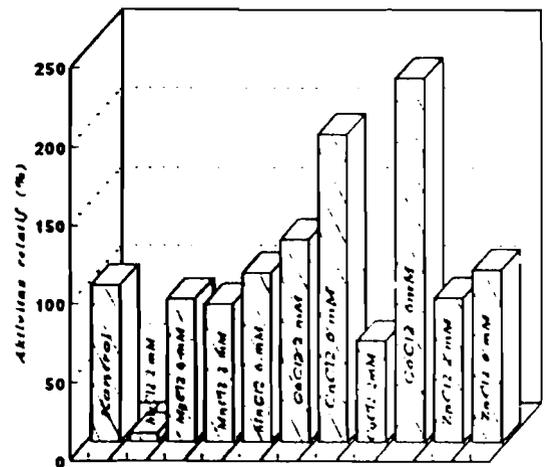
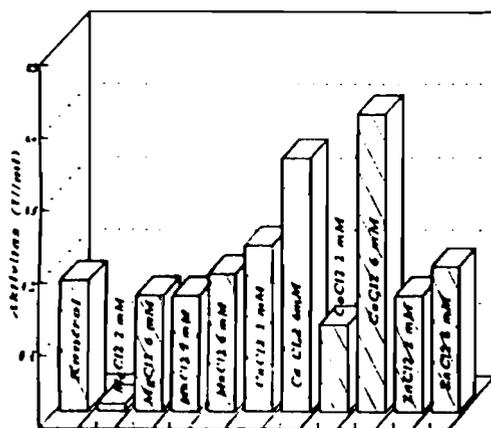
Penambahan CoCl₂ pada kosentrasi 6 mM menghasilkan aktivitas tertinggi yaitu sebesar 0,412 U/ml atau 231,46% relatif terhadap kontrol. Dengan demikian protease dari *Bacillus pumilus* Y1 membutuhkan ion Co²⁺ untuk meningkatkan aktivitasnya.



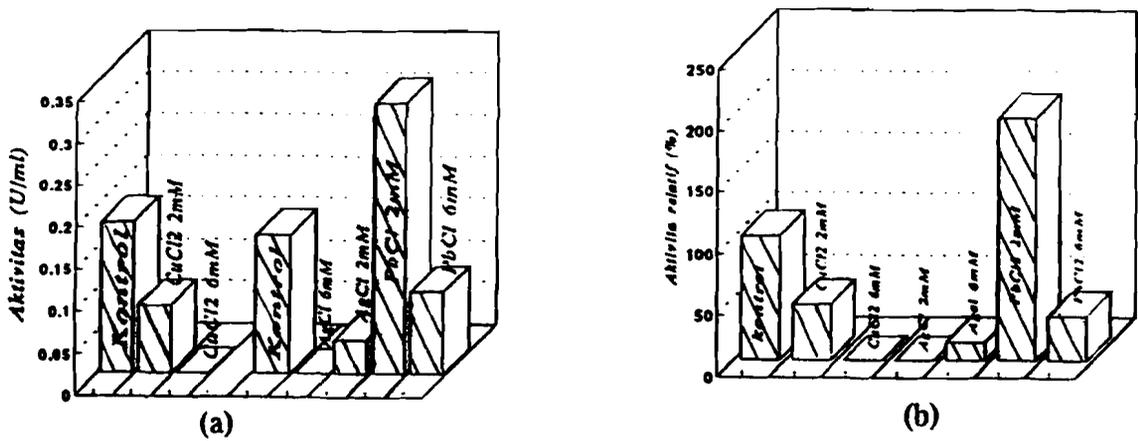
Gambar 1. Penentuan suhu optimum (a) dan pH optimum (b) bagi aktivitas protease *Bacillus pumilus* Y1



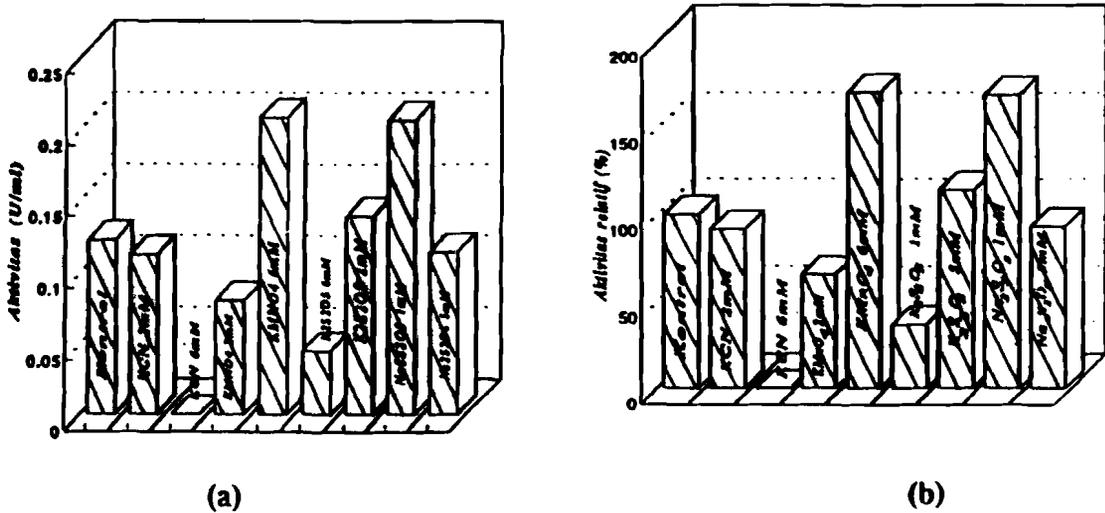
Gambar 2. Pengaruh logam monovalen terhadap aktivitas protease *Bacillus pumilus* Y1, a: aktivitas absolut, b: aktivitas relatif



Gambar 3. Pengaruh logam divalen terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1, a: aktivitas absolut, b: aktivitas relatif



Gambar 4. Pengaruh logam berat terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1, a: aktivitas absolut, b: aktivitas relatif.



Gambar 5. Pengaruh senyawa pereduksi dan pengoksidasi terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1, a: aktivitas absolut, b: aktivitas relatif

Pengaruh Logam Berat

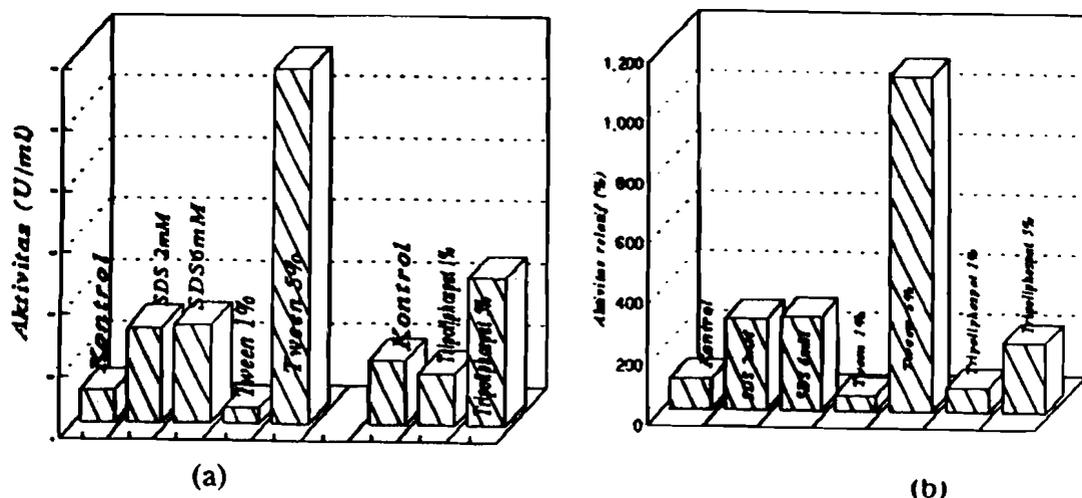
Enzim merupakan sebuah protein dimana aktivitas biologisnya sebagian besar dapat dirusak oleh pemberian asam atau basa mineral kuat, panas, urea, dan guanidin, serta dapat dirusak pula oleh logam berat (pb, Hg, dan Ag) atau pelarut organik pada atau diatas suhu kamar (Harper 1983). Pengaruh logam berat terhadap aktivitas enzim protease dari *Bacillus pumilus* Y1 dapat dilihat pada Gambar 4.

Kekuatan penghambatan untuk setiap logam berat berbeda-beda, hingga saat ini belum dapat dijelaskan secara stoikiometri. Kecualian adalah pada logam Pb²⁺ dengan konsentrasi rendah (2 mM) aktivitas yang dihasilkan meningkat 96,9% lebih dari kontrol, sedangkan pada konsentrasi tinggi (6 mM)

mempunyai efek penghambatan pula pada Gambar 4 terlihat kontrolnya ada dua, karena pengujian untuk pengaruh ion Cu²⁺ dilakukan pada hari yang berbeda (kontrol pertama untuk CuCl₂, kontrol kedua AgCl dan PbCl).

Pengaruh Senyawa Pereduksi dan Pengoksidasi

Pada penelitian ini juga diteliti pengaruh senyawa pereduksi dan pengoksidasi terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1. Senyawa kimia yang termasuk golongan ini dan digunakan selama penelitian adalah KCN dan KMnO₄ pada 2 dan 6mM, sedangkan K₂S₂O₈ dan Na₂S₂O₈ pada konsentrasi 1 dan 5 mM. Sebagai perbandingan digunakan enzim tanpa penambahan bahan kimiawi



Gambar 6. Pengaruh detergen terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1, a:aktivitas absolut, b: aktivitas relatif

(kontrol) dengan aktivitas sebesar 0.122U/ml. Hasil percobaan dapat dilihat pada gambar 5.

Schwimmer (1981) menyatakan bahwa sodium bisulfit akan mencegah autoksidasi yang dapat membentuk spesies oksogen yang relatif sehingga merusak enzim. Pada enzim dehidrogenase, antioksidan dapat mensubstitusi akseptor elektron seperti ferisianida untuk oksigen. Hal ini akan meningkatkan stabilitas in vivo enzim tersebut. Penambahan KCN pada konsentrasi 2mM terhadap larutan enzim protease aktivitasnya menjadi 0,112 U/ml (Gambar5), Terjadi penurunan aktivitas sebesar 8,20% dari kontrol. Sejalan dengan kenaikan kosentrasi KCN yaitu pada 6 mM aktivitas enzim benar-benar terhambat. Seperti terlihat pada gambar 5 penambahan $KMnO_4$ pada kosentrasi 6mM dapat meningkatkan aktivitas protease sebesar 70,5%. Begitu pula penambahan $K_2S_2O_5$ pada kosentrasi 5mM efektif dalam meningkatkan aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1 akan tetapi tidak efektif pada kosentrasi rendah (1mM). Pengaruh penambahan $K_2S_2O_5$ pada kosentrasi 5mM dapat meningkatkan aktivitas menjadi 0,139 U/ml atau sekitar 13,9% lebih tinggi dari kontrol. senyawa $Na_2S_2O_5$ 1mM juga efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim protease, aktivitas protease yang dihasilkan sebesar 0,206 U/ml lebih tinggi 68,8% dari kontrol.

Pengaruh Golongan Detergen

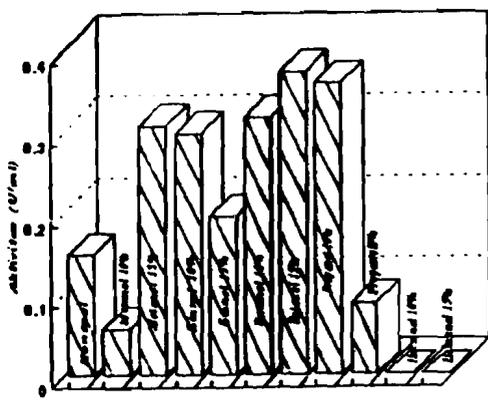
Bahan-bahan detergen yang digunakan pada penelitian ini SDS kosentrasi 2 dan 6 mM, serta Na-Tripoliphospat (TPP) dan Tween pada kosentrasi 1 dan 5 %. Hasil penelitian dapat dilihat pada gambar 6.

Kontrol ada dua, hal ini terjadi karena pengujian terhadap pengaruh TPP dilakukan pada hari yang berbeda. Kontrol pertama untuk SDS dan Tween sedangkan kontrol kedua untuk TPP. Aktivitas tertinggi dipengaruhi oleh enzim yang ditambah Tween 5% (0,576 U/ml) atau sekitar 1107,69% relatif terhadap kontrol. Akan tetapi penambahan pada Tween pada kosentrasi 1% menghasilkan aktivitas yang rendah, dengan demikian Tween yang digunakan efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim protease pada kosentrasi yang cukup tinggi.

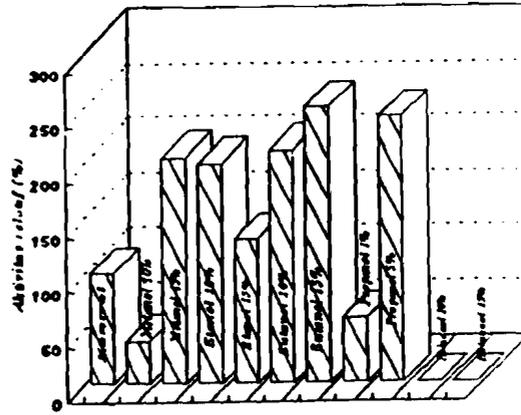
Pengaruh Golongan Alkohol

Senyawa hidrofilik akan mempengaruhi interaksi hidropobik antara residu asam amino non polar. Alkohol dengan berat molekul yang rendah telah menghasilkan paten untuk menstabilkan papain (Schwimer, 1981). Sesuai dengan sifatnya apabila senyawa hidrifilik ini ditambahkan kedalam larutan enzim akan akan meningkatkan interaksi hidropobik diantara molekul protein enzim sehingga dapat meningkatkan kestabilan enzim. Pada penelitian ini digunakan kedua jenis senyawa alkohol yaitu senyawa alkohol yang termasuk golongan monohidrat dan golongan alkohol polihidrat.

Alkohol mohidrat yang digunakan adalah metanol, etanol, butanol, propanol, dan heksanol masing-masing pada kosentrasi 10 dan 15%. Seperti terlihat pada gambar 7 penambahan metanol, butanol dan propanol pada kosentrasi 15% efektif untuk meningkatkan aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1. Aktivitas protease yang dihasilkan masing-

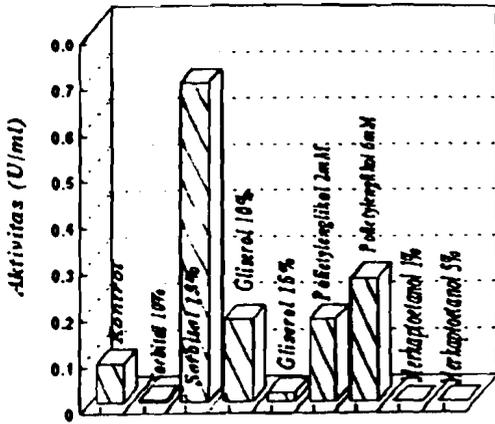


(a)

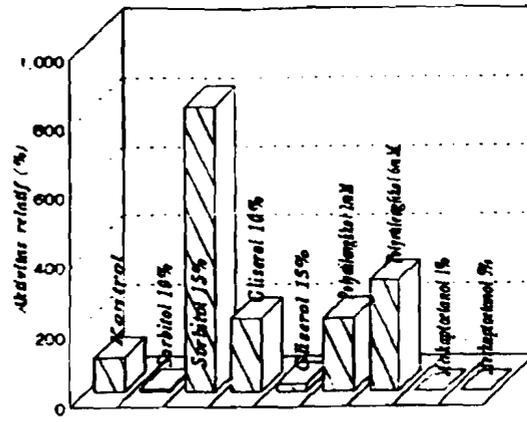


(b)

Gambar 7. Pengaruh alkohol monohidrat terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1, a: aktivitas absolut, b: aktivitas relatif

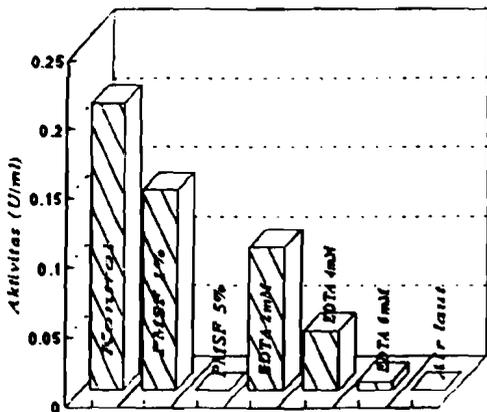


(a)

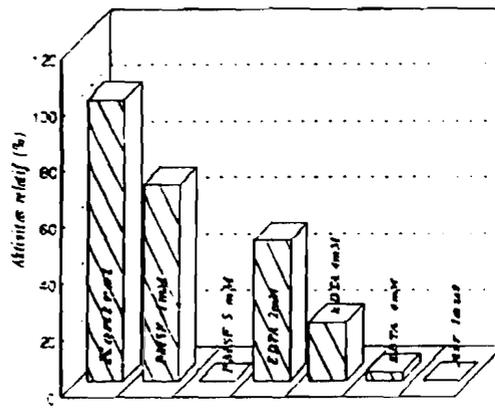


(b)

Gambar 8. Pengaruh alkohol polihidrat terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1, a: aktivitas absolut, b: aktivitas relatif



(a)



(b)

Gambar 9. Pengaruh kimiawi lainnya terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1, a: aktivitas absolut, b: aktivitas relatif

masing sebesar 0,306 U/ml, 0,373 U/ml, dan 0,359 U/ml. Dengan demikian butanol 15% dapat meningkatkan aktivitas protease tertinggi yaitu sebesar 250,34% relatif terhadap kontrol. Akan tetapi penambahan heksanol tidak efektif bahkan menghambat aktivitas protease.

Alkohol polihidrat yang sering digunakan sebagai penstabil enzim adalah sarbitol, manitol, xilitol, dan eritriol (Lindsay, 1976). Golongan alkohol polihidrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sarbitol, gliserol pada konsentrasi 10 dan 15%, merkaptopmetanol pada konsentrasi 1 dan 5% sedangkan polietylen glikol (PGE) pada konsentrasi 2 dan 6 mM, Pengaruh golongan alkohol polihidrat terhadap aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1 dapat dilihat pada Gambar 8. Penambahan sarbitol pada konsentrasi 15% dapat meningkatkan aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1 paling besar dibanding yang lain yaitu sebesar 0,689 U/ml, atau sebesar 820,24% relatif terhadap kontrol.

Pengaruh lingkungan Kimiawi Lainnya

Yang dimaksud bahan kimiawi lainnya pada penelitian ini adalah PMSSF (Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride) pada konsentrasi 1 dan 5 mM, sodium EDTA (2,4 dan 6 mM) dan air laut yang diambil dari laut diancol Jakarta. PMSF merupakan senyawa kimia yang bersifat inhibitor spesifik terhadap protease golongan serin yang memerlukan penanganan yang hati-hati karena bersifat racun. PMSF yang akan digunakan dilarutkan terlebih dahulu dalam larutan formamid, dalam hal ini formamide bersifat sebagai pelarut dan pengencer sebab PMSF tidak larut dalam air. Sedangkan sodium EDTA merupakan contoh senyawa yang dapat mengelap logam. Menurut Aunstrup (1979), EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) merupakan senyawa penghambat bagi enzim golongan protease logam.

Pengaruh PMSF, EDTA dan air laut terhadap aktivitas protease dapat dilihat pada Gambar 9. Penambahan PMSF pada konsentrasi 1mM aktivitas proteasenya turun menjadi 0,144 U/ml padahal aktivitas kontrol sebesar 0,207 U/ml. Dengan demikian konsentrasi 1mM PMSF aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1 hilang sebesar 30,44% , bahkan penambahan PMSF pada konsentrasi 5 mM aktivitas proteasenya sudah tidak ada.

Selain PMSF sebagai inhibitor spesifik yang digunakan dalam penelitian ini juga digunakan bahan kimiawi spesifik lainnya yaitu

EDTA pada konsentrasi 2,4 dan 6 mM. Dari hasil penelitian ini ternyata kenaikan konsentrasi EDTA yang ditambahkan aktivitas protease yang dihasilkan semakin turun, pada konsentrasi EDTA 2,4 dan 6 mM berturut-turut aktivitas protease yang dihasilkan sebesar 0,103, 0,034 dan 0,007 U/ml, atau aktivitas sisanya sebesar 49,8, 20,77 dan 3,4%. Hasil tersebut dapat memperkuat dugaan bahwa enzim protease ini membutuhkan ion logam untuk aktivitasnya. Begitu pula penambahan air laut pada filtrat enzim tidak efektif bahkan menghambat aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1.

Daya Tahan Panas Protease

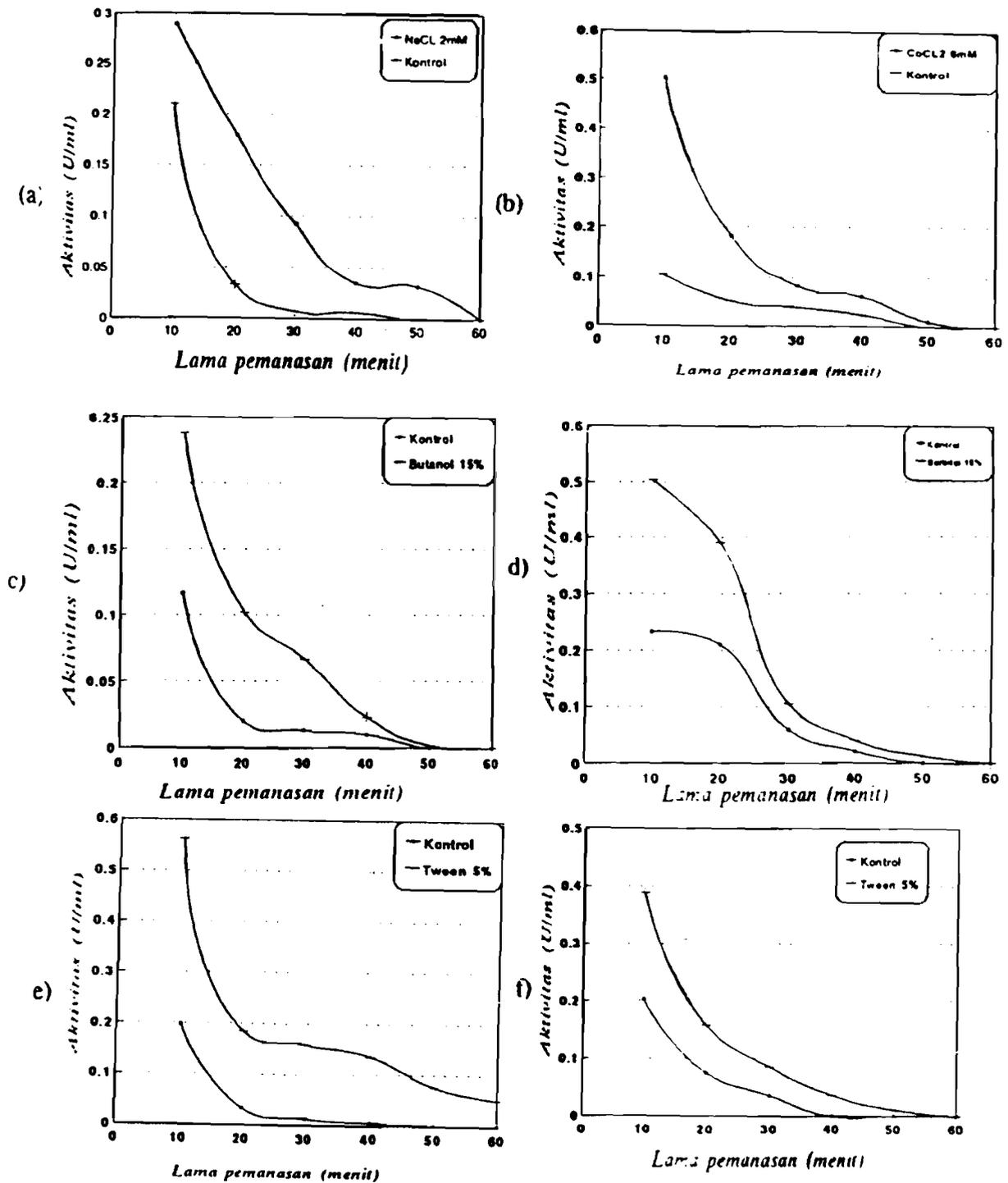
Penentuan daya tahan panas protease dilakukan dengan cara inkubasi pada suhu 55°C dan 90°C selama 60 menit dan pada tiap-tiap 10 menit dilakukan pengujian aktivitas. Sebelumnya enzim diuji daya tahan panasnya ditambahkan bahan kimiawi yang memberikan aktivitas tertinggi (NaCl 2mM, CoCl₂ 6 mM, butanol dan sarbitol 15%, serta Tween 5%). Pengaruh bahan-bahan kimia tersebut terhadap daya tahan protease pada suhu 55°C tertera pada Gambar 10.

Ketahanan panas dinyatakan sebagai waktu inkubasi (menit) pada suhu tertentu untuk tersisa 50% dari aktivitas kontrol (tanpa perlakuan, pada inkubasi 10 menit) pada suhu yang sama. Garis dengan anak panah menunjukkan cara membaca ketahanan panas protease dan berlaku untuk gambar-gambar yang lainnya. Ketahanan panas protease dari *Bacillus pumilus* Y1 pada suhu 55°C tertinggi dicapai setelah filtrat enzim ditabuh CoCl₂ 6mM (tahan selama 43 menit) dan Tween 5% (tahan selama 48 menit), sedangkan kontrol paling tahan rata-rata selama 20 menit,

Pada suhu 90°C protease yang dijadikan kontrol, hanya tahan panas selama 18 menit sedangkan protease yang sudah ditambah dengan Tween 5%, aktivitasnya protease tahan sampai menit ke-28. Penambahan Tween pada konsentrasi 5% pada suhu 90°C sampai menit ke-50 masih memperlihatkan adanya aktivitasnya, sedangkan kontrol hanya terlihat sampai menit ke-30.

KESIMPULAN

Aktivitas protease dari *Bacillus pumilus* Y1 yang diproduksi pada media limbah cair tahu dan diperkaya dengan susu skim 5%, optimum pada suhu 37°C dan pH sekitar 8. Aktivitas proteasenya hilang setelah penam-



Gambar 10. Penentuan daya tahan panas protease dari *Bacillus pumilus* y1

- a. Penambahan NaCl 2mM (55°C)
- b. Penambahan CoCl₂ 6mM (55°C)
- c. Penambahan butanol 15% (55°C)
- d. Penambahan orbitol 15% (55°C)
- e. Penambahan Tween 5% (55°C)
- f. Penambahan Tween 5% (90°C)

bahan PMSF 5 mM dan air laut, sedangkan penambahan EDTA pada konsentrasi 2,4 dan 6 mM menghasilkan pengaruh penghambatan yang semakin nyata dengan meningkatkan konsentrasi.

Penambahan bahan kimia yang dapat meningkatkan aktivitas dengan hasil tertinggi adalah NaCl 2 mM (0,373 U/ml), CoCl₂ 6mM (0,412 U/ml), PbCl₂ 2mM (0,322 U/ml) KMnO₄ 6 mM (0,208 U/ml), Tween 5% (0,576 U/ml), butanol 15% (0,373 U/ml) dan sarbitol 15% (0,689 U/ml). Dengan demikian penambahan bahan-bahan kimiawi tersebut dapat meningkatkan aktivitas masing-masing sebesar 117, 131, 96,6, 70,5, 1007, 150 dan 720%.

Secara umum penambahan logam berat dapat merunkan aktivitas protease kecuali pada penambahan PbCl₂ pada konsentrasi 2mM aktivitas enzim yang dihasilkan lebih tinggi daripada enzim kontrol. Lain halnya penambahan golongan alkohol monohidrat dan golongan polihidrat secara umum dapat meningkatkan aktivitas protease. Golongan alkohol monohidrat yang memberikan aktivitas paling tinggi adalah butanol 15%, sedangkan dengan golongan alkohol polihidrat aktivitas paling tinggi diperoleh setelah filtrat enzim ditambah dengan sarbitol 15%. Akan tetapi ada pula yang dapat menghambat aktivitas protease seperti penambahan heksanol dan merkaptotanol.

Daya tahan panas tertinggi (pada suhu 55°C) setelah Filtrat enzim ditambahkan dengan CoCl₂ 6mM (tahan selama 35 menit) dan Tween 5% (tahan selama 48 menit). Penambahan Tween 5% terhadap filtrat enzim, pada suhu inkubasi selama 90°C daya tahan panasnya sampai 28 menit dan aktivitas protease-nya masih terlihat sampai pada menit ke-50.

DAFTAR PUSTAKA

- Aunstrup, K. 1979. Production, Isolation and Economic of Extacellular Enzymes. Dalam L.B Wingrad, E.K. Katzier dan L. Goldstein (eds.). Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol. II. Academic Press, New York.
- Bergmeyer, H.V. dan Grassl, 1983. Methods of Enzymatic Analysis. Vol II. Verlag Chemi. Weinheim.
- Harper, H., Rodwell, V.W. dan PA. Mayes . 1979. Biokimia. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- 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.
- Lindsay, R.C. 1976. Other Desirable Constituents of Food. Di Dalam O.R. Fennema (ed). Principle of Food Science. Part I, Food Chemistry. Marcell, Dekker, New York.
- Mosan, P. dan D. Combess. 1984. Stabilization of Enzyme Activity. The Proceedings of Biotechnology '84 Europe online 1984. Published by Online Publication, Ltd., London.
- Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinases. Adv. Enzymol, 41:1779-143.
- Priest, F.G. 1977. Extacellular enzymes synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriological Rev. 41(3):711-753.
- Schwimer. 1981. Source Book of Food Enzymology. The AVI Pub. Co., Westport, Connecticut.
- Standbury, P.F. dan A. Withaker. 1984. Principles of Fermentations Technology. Pergamon Press, Ltd., Oxford.
- Webb, E.C. dan M. Dixon. 1979. Enzymes, Academic Press, New York.
- Wiramargana, M. 1991. Pengaruh Penggunaan Aditif Terhadap Stabilitas Enzim Protease *Bacillus subtilis* Selama Penyimpanan. Skripsi. FATETA-IPB, Bogor.
- Yamamoto, A. 1975. Proteolytic Enzymes, Di Dalam G. Reed (Ed). Enzymes in Food Processing. Academic Press, New York.

Your Partner in Laboratory Products



OXOID - ENGLAND

Dehydrated Culture Media
 Laboratory Preparations
 Sterile Reagents
 Biochemical Reagents
 Diagnostic Reagents
 Antibiotic Susceptibility
 Complete Anaerobic Systems, Etc.

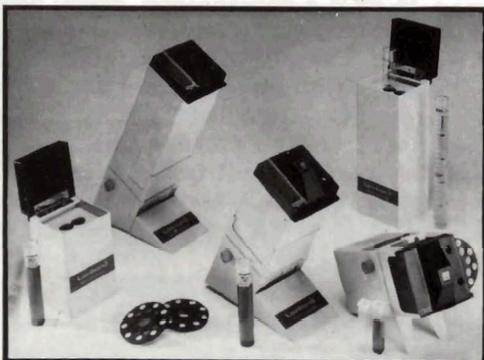


J.T. BAKER - USA

Laboratory Reagents and Chromatography Products

Baker Analyzed Reagents ...
 for Industrial QC and R&D

Baker Analyzed HPLC solvents ...
 Value-Oriented Customers in all Industrial
 Laboratories, Government and University



TINTOMETER - ENGLAND

Lovibond '2000 Comparator
 Nesslerisers
 Complete Range of Standard Colour Discs
 Reagents and Indicator
 'CHECKIT' Test Kits, Etc.

Sole Agent :



P.T. DIPA PHARMALAB INTERSAINS

Jl. Taman Tanah Abang III/25 Jakarta 10160 - INDONESIA

Phone : (021) 3853274 (HUNTING)
 Fax : (021) 3853275
 P.O. Box : 2862 / Jakarta 10028
 Pager : (021) 13011 I.D. 66036 atau
 (0251) 242400 I.D. B 416