

Imobilisasi Protease *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Menggunakan Matriks Gel Poliakrilamida

Immobilization of Protease from Bacillus subtilis ATCC 6633 in Polyacrylamide Gel Matrix

NISA RACHMANIA MUBARIK

Jurusan Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Tel. +62-251--311681, Fax. +62-251-328337

Diterima 8 Agustus 2000/Disetujui 5 Februari 2001

Extracellular protease excreted by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was immobilized by entrapment in polyacrylamide gel (19% T, 1.6% C). The optimum conditions of free proteolytic activity occurred at 55°C, pH 8.0, and 20 minutes incubation. The optimum conditions of immobilized were shifted on temperature and incubation times to be 50°C and 25 minutes. Kinetic study of the immobilized protease indicated that it had Michaelis-Menten constant apparent 4.11% and maximum activity apparent 411.52 unit/mg/25 minutes. The immobilized protease showed its activity up to four times reused.

PENDAHULUAN

Pemakaian enzim dalam keadaan bebas, yaitu terlarut dalam air, kurang menguntungkan karena enzim hanya dapat digunakan untuk satu kali reaksi. Salah satu metode agar enzim tersebut dapat dipakai berulang adalah menggunakan teknik imobilisasi enzim.

Imobilisasi enzim merupakan metode yang membatasi pergerakan molekul enzim secara fisik dalam ruang reaksi yang dikatalisisnya. Imobilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain melalui pengikatan kimiawi molekul enzim pada bahan pendukung, pengikatan silang intermolekuler sesama enzim, atau dengan cara menjebak enzim di dalam gel atau membran polimer (Palmer 1991).

Teknik imobilisasi yang dipilih seharusnya memenuhi kriteria utama, yaitu tidak terjadi perubahan konformasi enzim dan tidak mengganggu gugus fungsi di pusat aktif enzim. Metode penjebakan enzim lebih banyak digunakan karena enzim ada dalam keadaan bebas dan tidak terikat pada bahan pendukung sehingga secara relatif fungsi katalitik dan struktur alami molekul enzim tidak mengalami gangguan guncangan (Kierstan & Coughlan 1985, Wirahadikusumah 1988). Teknik penjebakan ini telah banyak diterapkan pada berbagai enzim yang tidak mengalami inaktivasi selama proses penjebakan. Sebagai contoh, Das *et al.* (1998) berhasil menjebak urease pada matriks gel poliakrilamida dan kalsium alginat untuk diaplikasikan dalam biosensor dan bioreaktor membran.

Imobilisasi enzim di dalam matriks gel poliakrilamida dilakukan dengan cara mencampurkan enzim dengan larutan bufer, monomer akrilamida dan senyawa pengikat silang N,N'-metilenbisakrilamida. Proses polimerisasi diawali dengan suatu sistem redoks, seperti senyawa potasium persulfat dan tetrametilendiamina. Teknik ini pertama kali diperkenalkan oleh Bernfeld *et al.* pada tahun 1963 untuk

menjebak enzim tripsin, papain, dan amilase (Chibata 1978, Kierstan & Coughlan 1985).

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian karakterisasi dan pemurnian protease *Bacillus subtilis* (Mubarik & Wirahadikusumah 1996). *Bacillus subtilis* dikenal sebagai penghasil aktif protease ekstrasel. Protease dari spesies bakteri ini telah banyak digunakan dalam industri, antara lain industri detergen dan kulit. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan imobilisasi protease ekstraseluler *B. subtilis* ATCC 6633 dengan menggunakan metode penjebakan di dalam matriks gel poliakrilamida. Pengamatan terhadap protease imobil terdiri atas karakter biokimiawi dari kondisi optimum aktivitas enzim dibandingkan dengan enzim bebas, dan kestabilan pemakaian berulang selama selang waktu tertentu.

BAHAN DAN METODE

Biakan dan Media. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 diperoleh dari koleksi Laboratorium Biokatalisis PAU Bioteknologi ITB. Biakan disimpan dan diremajakan pada media agar nutrisi. Komposisi media pertumbuhan dan media untuk produksi protease ekstraseluler sama seperti yang digunakan Mubarik dan Wirahadikusumah (1996).

Produksi Protease Ekstraseluler. Metode untuk produksi protease ekstraseluler sampai tahap pemekatan menggunakan aseton dingin (fraksi 30-50%) dan dialisis sesuai Mubarik dan Wirahadikusumah (1996). Enzim ini digunakan untuk proses imobilisasi dan sebagai enzim bebas yang berfungsi sebagai kontrol pembandingan bagi protease imobil.

Pengujian Aktivitas Protease dan Penentuan Kadar Protein. Aktivitas protease diuji dengan metode Kunitz yang dimodifikasi menggunakan substrat kasein 1% (Aderibigbe & Odunfa 1988). Kadar protein diukur dengan metode Lowry (Lowry *et al.* 1951). Sedangkan sebagai standar protein

digunakan Bovine serum albumin (BSA) fraksi V pada kisaran 0-200 mg/ml. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang menyebabkan kenaikan absorbansi sebesar 0.001 di atas kontrol pada kondisi optimum percobaan.

Imobilisasi Protease. Sebanyak 2 ml enzim hasil dialisis (1577.7 unit/mg) ditambahkan pada campuran 1.5 g akrilamida, 8 ml bufer tris HCl 0.05 M dan 0.025 g N,N'-metilen bisakrilamida (19% T, 1.6% C, T = akrilamida + monomer pengikat silang/volume bufer, C = jumlah pengikat silang per total monomer). Pembentukan gel dipercepat dengan mereaksikan 1 ml 2.5% $K_2S_2O_8$ dan 5% amonium persulfat-N,N,N,N'-tetrametiletilediamin (TEMED) ke dalam campuran. Campuran dituangkan ke dalam cetakan dan disimpan dalam lemari pendingin (suhu 4°C) selama 22 jam. Gel yang terbentuk dipotong berukuran 2 x 2 x 2 mm³ dan direndam dalam 0.05 M bufer tris HCl (Tika 1993). Potongan gel enzim imobil seberat \pm 0.961 g setara dengan 0.1 ml protease bebas.

Uji Aktivitas Protease Imobil. Pengukuran aktivitas protease dan kadar protein enzim imobil dilakukan dengan metode yang sama seperti protease bebas. Kadar protein protease imobil merupakan hasil pengurangan kadar protein protease bebas dengan kadar protein protease yang terdapat dalam sisa larutan/rendaman yang tidak ikut membentuk gel.

Karakterisasi Aktivitas Protease Imobil. Protease imobil ditentukan aktivitas optimumnya pada kisaran pH 7.0-9.5, suhu 35-75°C dan waktu inkubasi 10-30 menit.

Penentuan Tetapan Michaelis-Menten *apparent* (Km app) Protease Imobil. Aktivitas protease imobil diukur pada kisaran konsentrasi substrat kasein (0.5-2.5%). Dari data yang diperoleh dibuat kurva Lineweaver-Burk untuk penentuan nilai Km.

Pemakaian Berulang Protease Imobil. Protease imobil disimpan pada dua kondisi suhu penyimpanan, yaitu suhu 4°C dan suhu kamar. Pada setiap kondisi suhu penyimpanan dilakukan pengukuran aktivitas protease imobil secara berulang sampai aktivitas protease hilang (nol). Potongan gel dicuci tiga kali dengan akuades dan 0.05 M bufer tris HCl pH 8.0. Kemudian potongan gel disimpan pada kondisi suhu simpan untuk dipakai kembali pada pengukuran aktivitas hari berikutnya.

HASIL

Efisiensi Imobilisasi Protein (EIP). Kadar protein protease bebas *B. subtilis* sebesar 0.344 mg/ml, setelah diimobil terjadi penurunan sampai tersisa 27% (0.093 mg/ml). Efisiensi imobilisasi protein (EIP) sebesar 27% dihitung berdasarkan hasil bagi kadar protein protease terimobil dengan kadar protein protease bebas. Aktivitas spesifik protease imobil (110 unit/mg) mengalami penurunan sebesar 31.2% dari protease bebas (160 unit/mg) (Tabel 1).

Pengukuran Kondisi Optimum Aktivitas Protease Imobil. Kondisi aktivitas protease imobil yang diamati meliputi pH, suhu dan waktu inkubasi (Gambar 1, 2 & 3). Kondisi pH optimum aktivitas protease bebas dan terimobil

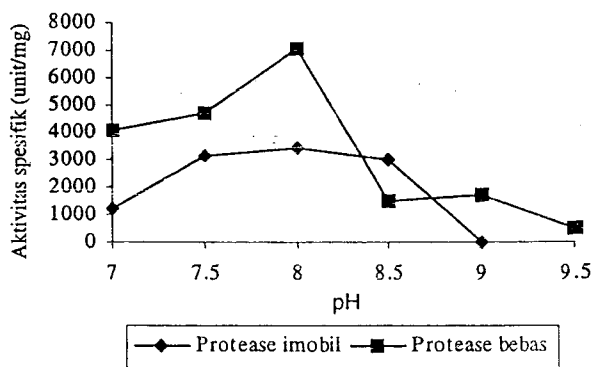
Tabel 1. Perbandingan kadar protein dan aktivitas spesifik protease *Bacillus subtilis* bebas dan terimobil.

Enzim	Kadar protein (mg/ml)	Kadar protein (%)	Aktivitas spesifik (unit/mg)	Aktivitas spesifik (%)
Protease bebas	0.344	100	160	100
Protease terimobil	0.093	27	110	68.8

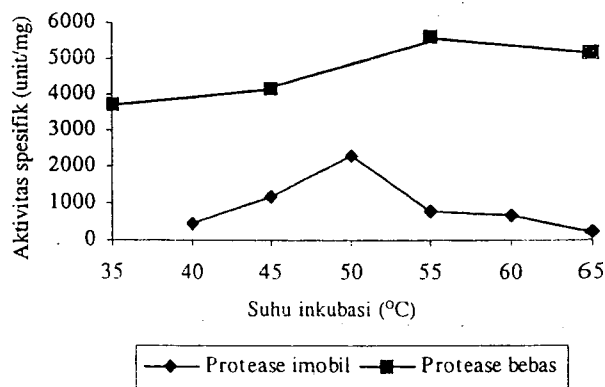
tidak berbeda (pH 8.0). Suhu optimum protease mengalami perubahan dari 55°C (protease bebas) menjadi 50°C (protease imobil). Waktu inkubasi mengalami pergeseran dari 20 menit (protease bebas) menjadi 25 menit (protease imobil).

Penentuan Tetapan Michaelis-Menten *apparent* (Km app). Nilai Km app dan Vmaks app ditetapkan berdasarkan grafik Lineweaver-Burk (Gambar 4). Hasil perhitungan menggunakan persamaan regresi linear: menghasilkan Km protease bebas 0.89% dan Km app protease imobil 4.11% sedangkan Vmaks protease bebas 347.22 unit/mg/25 menit dan Vmaks app protease imobil 411.52 unit/mg/25 menit.

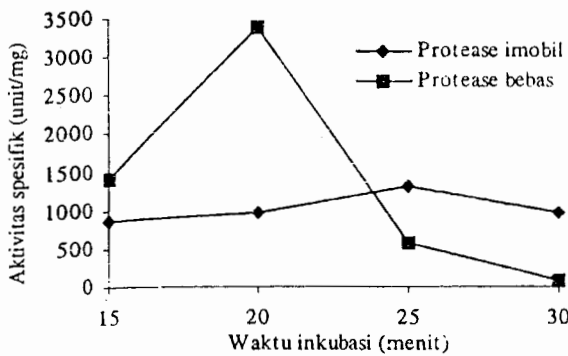
Pemakaian Berulang Protease Imobil. Kestabilan enzim protease imobil diukur pada kondisi optimum (pH 8.0, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 25 menit) secara berulang sampai aktivitasnya hilang (nol) (Gambar 5). Aktivitas relatif protease imobil yang disimpan pada suhu kamar masih tersisa 86% setelah empat kali dipakai ulang, sedangkan yang disimpan pada suhu 4°C pada pemakaian kedua aktivitas tersisa 35%. Aktivitas protease pada kedua suhu penyimpanan hilang pada pemakaian kelima kali.



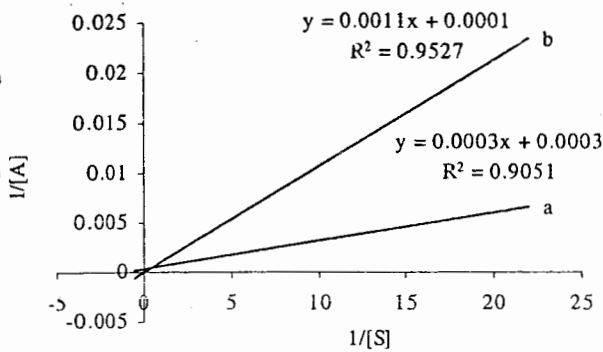
Gambar 1. Aktivitas protease *Bacillus subtilis* pada berbagai pH.



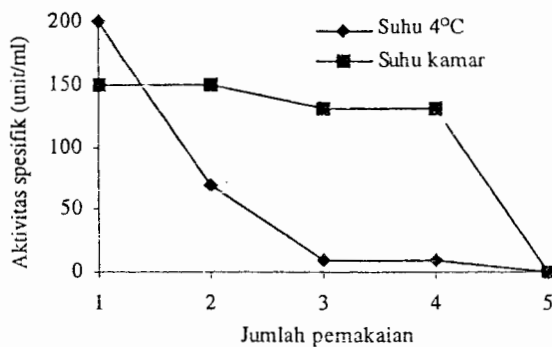
Gambar 2. Aktivitas protease *Bacillus subtilis* pada berbagai suhu inkubasi.



Gambar 3. Aktivitas protease *Bacillus subtilis* pada berbagai waktu inkubasi.



Gambar 4. Kinetika reaksi protease *Bacillus subtilis*, a. protease bebas, b. protease imobil.



Gambar 5. Pemakaian ulang protease *Bacillus subtilis* imobil pada suhu penyimpanan 4°C dan suhu kamar.

PEMBAHASAN

Nilai EIP dari enzim imobil *B. subtilis* sebesar 27%. menunjukkan terjadi penurunan kadar protein protease setelah diimobil dibandingkan protease bebas. Nilai EIP protease imobil ini jauh lebih rendah daripada protease (pronase) *Streptomyces griseus* sebesar 90.3%. Imobilisasi protease tersebut menggunakan komposisi gel poliakrilamida 19% T, 1.6% C seperti yang dilakukan pada penelitian ini (Tika 1993).

Nilai EIP yang rendah pada penelitian ini dapat disebabkan: i. ukuran protein enzim yang terjebak lebih kecil daripada ukuran pori yang terbentuk, sehingga protein enzim yang terjebak mudah ke luar dari pori gel. Efisiensi imobil menurut Chibata (1978) bergantung pada perbandingan antara jumlah protein dan jumlah matriks yang digunakan pada

proses pembuatan enzim imobil; ii. gel poliakrilamida yang terbentuk kurang kuat secara mekanik (lentur) sehingga selama proses pengadukan dapat terjadi pengeluaran protein enzim yang telah terjebak, dan iii. pada saat awal polimerisasi matriks gel (± 4 menit pertama reaksi polimerisasi) dihasilkan panas (eksoterm) sampai lebih dari suhu 75°C yang dapat menyebabkan sebagian protein mengalami denaturasi sehingga enzim menjadi inaktif (Wheatley & Philips 1983).

Kondisi optimum aktivitas protease terimobil dibandingkan dengan protease bebas menunjukkan pH optimum yang sama, yaitu 8.0. Gel poliakrilamida bersifat nonionik yang berpengaruh meminimumkan pergeseran pH enzim imobil dari enzim bebas (Kierstan & Coughlan 1985). Pergeseran pH optimum ke arah basa atau asam dapat terjadi bila ada perubahan derajat ionisasi residu asam amino pada sisi aktif enzim (Palmer 1991).

Waktu inkubasi optimum protease imobil mengalami kenaikan lima menit lebih lama daripada protease bebas, hal ini disebabkan kontak antara enzim dan substrat tidak terjadi secara langsung seperti protease bebas. Pada enzim imobil terjadi batasan difusi (*diffusion barrier*) karena adanya matriks. Substrat harus terlebih dahulu masuk ke dalam pori matriks sebelum bereaksi dengan pusat aktif enzim (Trevan 1980).

Kondisi pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim menunjukkan protease terimobil mengalami penurunan suhu optimum. Fenomena penurunan suhu optimum yang sama dari 55°C (enzim bebas) menjadi 50°C (enzim imobil) terjadi pada enzim invertase yang diimobil dalam gel poliakrilamida. Fenomena perubahan ini tidak terjadi pada enzim asparaginase (Chibata 1978). Tampaknya kondisi suhu optimum enzim imobil bergantung dari jenis enzim dan metode imobilisasi yang digunakan.

Kinetika protease imobil dibandingkan dengan protease bebas menunjukkan kenaikan nilai K_m app dan V_{max} app. Nilai K_m app protease imobil empat kali lebih tinggi daripada protease bebas. Nilai K_m app ditentukan oleh faktor difusi. Pada enzim yang diimobil dengan cara penjebakan, nilai K_m app meningkat karena terjadi penurunan konsentrasi substrat di dalam matriks. Permeasi substrat ke dalam pori matriks menjadi terbatas, akibatnya konsentrasi substrat di bagian dalam menjadi lebih rendah daripada di bagian luar matriks. Nilai K_m app akan naik dengan semakin meningkatnya ketebalan matriks (Chibata 1978, Palmer 1991).

Salah satu keuntungan enzim imobil dibandingkan enzim bebas yaitu kemampuan enzim dipakai ulang. Kestabilan enzim imobil dipakai ulang akibat pengaruh halangan sterik (*steric hindrance*) terutama terjadi pada senyawa berbobot molekul besar, seperti enzim proteolitik lain, atau sel kontaminan yang mendigesti protein enzim yang dijebak di dalam matriks (Chibata 1978).

Penelitian ini menggunakan suhu penyimpanan 4°C dan suhu kamar untuk menyimpan enzim imobil. Pada kedua suhu tersebut aktivitas proteolitik protease imobil masih terukur sampai empat kali pemakaian ulang, dan aktivitasnya hilang pada hari kelima. Selama enzim dipakai berulang dapat terjadi pelepasan enzim dari matriks sehingga jumlah enzim berkurang, atau terjadi perubahan sifat fisiko kimia di dalam

campuran reaksi yang menyebabkan kurang aktifnya gugus fungsi pada sisi aktif enzim tanpa terjadi perubahan konformasi enzim. Hal seperti ini dapat menyebabkan inaktivasi enzim (Trevan 1980).

Protease merupakan enzim yang banyak digunakan dalam industri. Penggunaan protease imobil dibandingkan protease bebas memiliki keuntungan antara lain mengurangi biaya produksi dan mencegah inaktivasi akibat autodigesti (Trevan 1980). Poliakrilamida yang digunakan sebagai matriks imobil memiliki kekurangan dan keuntungan. Salah satu kekurangannya ialah bila enzim imobil digunakan dalam proses yang memerlukan pengadukan. Enzim dapat keluar dari matriks yang menyebabkan aktivitasnya turun atau hilang. Keuntungan dari metode ini selain proses pembuatan relatif cepat, juga dapat meminimumkan perubahan pH optimum enzim karena matriks poliakrilamida bersifat nonionik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Almarhum Muhammad Wirahadikusumah yang telah membimbing penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Aderibigbe EY, Odunfa SA. 1988. Purification and characterization of extracellular proteinases excreted by a strain of *Bacillus subtilis* BS2, isolated from fermented African locust bean 'Iru'. *J Appl Bacteriol* 65:361-369.

- Chibata I. 1978. *Immobilized Enzymes. Research and Development*. Tokyo: Kodansha.
- Das N, Kayastha AM, Malhotra OP. 1998. Immobilization of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads. *Biotechnol Appl Biochem* 27:25-29.
- Kierstan MPJ, Coughlan MP. 1985. Immobilisation of cells and enzymes by gel entrapment. Di dalam: J. Woodward (ed). *Immobilised Cells and Enzymes. A Practical Approach*. Oxford: IRL Pr. hlm. 39-48.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mubarik NR, Wirahadikusumah M. 1995. Pemurnian dan karakterisasi protease ekstraseluler *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Hayati* 3:50-54.
- Palmer T. 1991. *Understanding Enzymes*. Ed ke-3. New York: Ellis Horwood.
- Tika IN. 1993. Probasa dari *Streptomyces griseus*: Isolasi, karakterisasi dan amobilisasi dengan khitin dan poliakrilamida. [Tesis]. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Trevan MD. 1980. *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology*. Chichester: J Wiley.
- Wheatley MA, Philips RC. 1983. Temperature effects during polymerization of polyacrylamide gels used for bacterial cell immobilization. *Biotechnol Bioeng* 25:623-626.
- Wirahadikusumah M. 1988. Teknik amobilisasi enzim dalam bidang pengobatan. *Acta Pharm Indon* 13:32-42.