DAYA TAHAN SIMPAN PROTEASE *Bacillus stearothermophillus, B. subtilis dan B. licheniformis*

(STORAGE LIFE OF PROTEASE FROM *Bacillus sp.*)

Maggy T. Suhartono[1], Nuri Andarwulan[1], Ika Malikah[2], dan Mariani[3]

ABSTRACT

The protease filtrate of B. stearothermophillus grown in liquid tofu waste supplemented with tapioca waste was stable up to 19 days of storage at 4 °C. Addition of 1% sorbitol increased the storage life. After 53 days of storage, the enzyme activity was still maintained at 59% level. Addition of $CoCl_2$ and glycerol were not effective. When the protease was coagulated by addition of 70% ammonium sulphate and further diluted in 0.02 M phosphated buffer, the enzyme was more stable during storage. The activity of protease produced from B. subtilis grown in liquid tofu waste supplemented with tapioca waste was detected up to 35 days of storage. Upon addition of 1% sorbitol, the activity by 75 days of storage was still at 39% of the original activity. Addition of 2 mM $CoCl_2$ or $MnCl_2$ could maintain the enzyme activity. After 75 days of storage, 20-30% of activity was still detected. Addition of 20% ammonium sulphate was also effective; after 60 days of storage, the loss of activity was only 10 percent. Protease filtrate from B. licheniformis grown in liquid tofu waste supplemented with glucose was much more stable than the other two proteases. At 4-10°C, the activity was still good up to 10 months of storage. When 1% sorbitol was added to the enzyme filtrate and stored at 4-10°C, no significant effect was detected. Addition of 1% glycerol increased the enzyme activity only during the first month of storage. Addition of 2 mM $MnCl_2$ increased the activity during the first-second month of storage, after that the divalent cation tend to decrease the activity. Addition of other divalent cation such as 2 mM $CoCl_2$ and 2 mM $CaCl_2$ tend to reduce the activity of enzyme. When stored at room temperature, the enzyme activity decreased to 50% after 2 months. During storage at room temperature, addition of sorbitol and glycerol were quite effective in maintaining the stability while addition of divalent cations ($MnCl_2$, $CoCl_2$ and $CaCl_2$) were not effective. Analysis of the effect of several additives upon kinetic parameters of the enzymes, Km (Michaelis Menten Constant) and Vmax (Maximum velocity), showed diverse pattern.

PENDAHULUAN

Diantara ribuan enzim yang daya kerjanya telah di teliti terdapat beberapa (± 20) yang diaplikasi komersialnya cukup menonjol. Salah satu diantaranya adalah protease, yaitu enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Dari segi ekonomi, protease merupakan enzim yang penting karena menguasai 59% dari total penjualan enzim dengan nilai mencapai 200 juta US $ per tahun. Industri pangan memanfaatkan protease dalam pembuatan roti, bir, pengempukan daging, serta industri keju. Sedangkan pada industri non pangan protease digunakan antara lain dalam deterjen berbagai produk medis dan industri kulit.

Meskipun protease dapat dihasilkan dari hewan maupun tumbuhan, namun adanya perkembangan teknologi yang pesat terutama di bidang bioteknologi telah menjadikan mikroba sebagai salah satu penghasil protease yang potensial. Protease dihasilkan oleh berbagai jenis mikroba, mulai dari bakteri, kapang, maupun khamir. Bakteri jenis *Bacillus, Pseudomonas, Proteus, Clostridium*, dan *Serratia*; serta jenis kapang *Mucor, Aspergillus*, dan *Penicillium* merupakan penghasil perotease yang potensial. Khamir penghasil protease ekstraseluler asam, netral, dan alkali adalah *Candida lipolytica*. (Aunstrup, 1979, Ward, 1983, Stanbury and Whitaker, 1984). Protease ekstraseluler *B. stearothermophilus* dapat bersifat protease logam-netral dan protease serin-alkali. Protease netral tersebut dikenal dengan nama termolisin. Enzim ini memiliki bobot molekul 34 000 dan mengandung 316 asam amino dalam rangkaian peptida tunggal tanpa jembatan disulfida. Termolisin, memiliki pH optimal sebesar 7. Enzim ini mengandung atom logam Zn yang terikat pada residu dua histidin dan asam glutamat. Dalam stabilitas molekul, atom Zn ini tidak memegang peranan yang penting (Weaver, (Priest, 1977, Ward, 1983).

Selama pertumbuhannya, *Bacillus subtilis* memproduksi tiga macam protease, yaitu protease netral, protease serin, dan esterase. Rasio pembentukan protease netral dan protease alkali dari *B. subtilis* berkisar antara 4:1 dan 1:1 (Priest, 1977).

Protease alkali yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis, amyloliquefaciens* dan, *B.stearothermophilus* dikenal sebagai subtilisin BPN (Bacterial Protease Nagarase). Dari segi komersial, subtilisin BPN kurang berperan bila dibandingkan dengan subtilisin Carslberg yang diproduksi

[1] *Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta-IPB, Kotak Pos 220, Kampus Darmaga, Bogor 16002*
[2] *PAU Bioteknologi, IPB*
[3] *Alumni Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, FATETA IPB*

oleh *B. licheniformis*. *Bacillus licheniformis* memproduksi minimum dua jenis protease dengan pH optimum 8.5 dan 10.3 (Halpern, 1981, Ward, 1983). Protease *B. licheniformis* termasuk protease serin yang memerlukan ion kalsium, dengan berat molekul 25-30 000 dalton. Ion kalsium ini berfungsi untuk meningkatkan stabilitas pada suhu tinggi atau kondisi pH yang ekstrim (Yamamoto, 1975).

Salah satu kekurangan yang dirasakan di dalam aplikasi enzim adalah enzim mudah mengalami degradasi aktivitas oleh lingkungan, sehingga menurunkan katalitik enzim. Terdapat beberapa cara untuk meningkatkan stabilitas enzim, yaitu aplikasi teknik imobilisasi, modifikasi kimia, rekayasa molekuler, dan penambahan aditif. Penggunaan aditif lebih sering dipilih karena relatif lebih mudah dan biayanya murah (Monsan dan Combess, 1984).

Banyak aditif telah dikemukakan sebagai penstabil enzim, dan beberapa telah menghasilkan paten untuk enzim serta aplikasi tertentu (Tabel 1).

Tabel 1. Beberapa paten aditif enzim[a)]

Enzim	Senyawa Penstabil
Gliserolkinase	Fraksi ekstrak protein dari khamir
Katalase	Asam askorbat; Natrium sitrat + gliserol + timol
Papain	Alkohol berat molekul rendah; kolagen terhidrolisa + gliserol borat
Pektase tomat	Asam borat
Amilase, protease	Diamin; poliamin
Glukooksidase	Metilselulosa

[a)] Schwimmer (1981)

Schwimmer (1981) menggolongkan aditif menjadi beberapa kelompok yaitu : substrat , senyawa hidrofilik, larutan garam dan gula, ion logam, anion, polianion, polikation, protein dan polimernya, inhibitor protease, senyawa pengkelat, anti buih, serta senyawa pereduksi dan antioksidan.

Di dalam penelitian ini dilakukan analisis efektivitas beberapa aditif terhadap protease *B. stearothermophillus*, *B. subtilis* dan *B. licheniformis* yang ditumbuhkan pada limbah cair tahu.

METODOLOGI

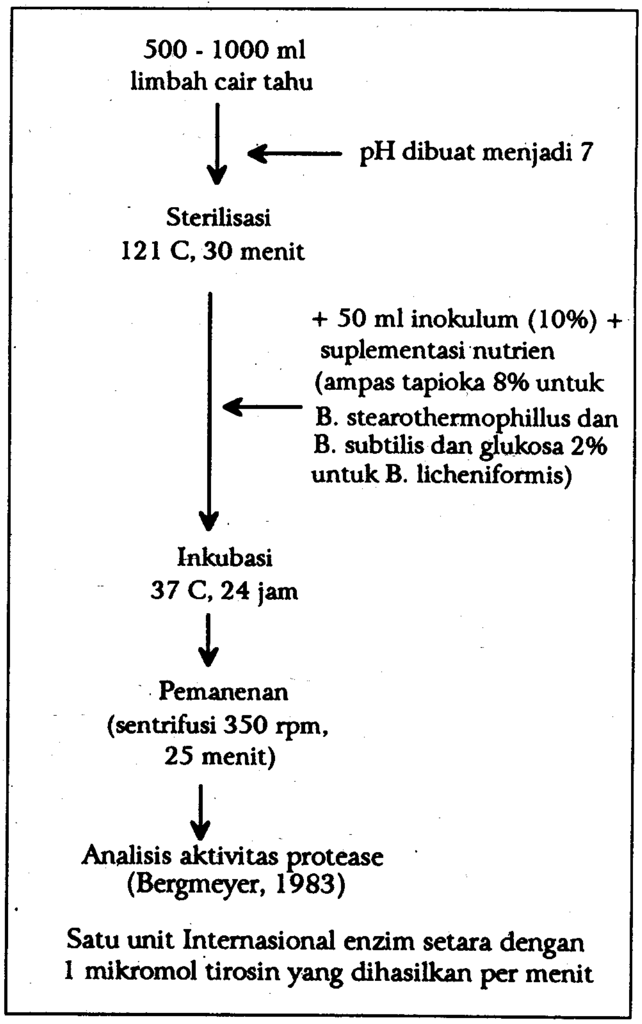
Bahan

Kultur *Bacillus sp. (B. stearothermophillus, B. subtilis* dan *B. licheniformis)* yang didapat dari Balai Penelitian Veteriner, Kotamadya Bogor, dipelihara dan diperbanyak pada medium nutrien agar. Bahan kimia untuk fermentasi, analisis protease dan perbagai percobaan penyimpanan (Sigma, BDH, Merck) diperoleh dari penyalur setempat. Limbah cair tahu diperoleh dari pabrik tahu di Cibanteng, Bogor.

Metode

Penyiapan inokulum dan produksi protease

Satu tabung biakan stok ditambah dengan 5 ml air steril, dituang ke dalam 50 ml limbah cair tahu steril, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Inokulum yang diperoleh digunakan untuk produksi protease.



Gambar 1. Diagram alir produksi protease *Bacillus sp.*

Pengaruh aditif terhadap kestabilan protease Bacillus sp.

Pengaruh penggunaan sorbitol (0,1%, 1%), logam Co, Mn, Ca (garam klorida pada 2 mM) gliserol (0,1%) dan amonium sulfat (20-70%) terhadap aktivitas protease yang dihasilkan dan kestabilannya selama penyimpanan dianalisis. Aditif ditambahkan pada awal penyimpanan yang dilakukan pada suhu 4-10°C. Aktivitas enzim dianalisis pada selang waktu tertentu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Stabilitas Protease *Bacillus stearothermophillus*

Aktivitas filtrat protease *Bacillus stearothermophillus* yang dihasilkan pada awal percobaan adalah sebesar 0,059 U/ml. Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa enzim kontrol (enzim tanpa penambahan aditif) ini, masih terlihat aktivitasnya hingga hari ke-12 (0,046 U/ml), tapi pada hari ke-19 sudah tidak ada aktivitasnya. Pada penambahan sorbitol 26,4% dan 1%, aktivitas sisanya masih terlihat hingga hari ke-53 yaitu masing-masing sebesar 0,049 U/ml dan 0.035 U/ml, masing-masing sebesar 83% dan 59,3% dari aktivitas enzim kontrol. Pada Gambar 2 terlihat juga bahwa gliserol tidak effektif di dalam menjaga kestabilan enzim, bahkan bersifat agak sedikit destruktif.

Sorbitol termasuk golongan polihidroksi alkohol yang dapat melakukan interaksi hidrogen dengan molekul air lingkungan sehingga penambahannya sampai konsentrasi tertentu ke dalam filtrat enzim yang strukturnya masih "fleksibel" kemungkinan meningkatkan interaksi hidrofobik di dalam molekul enzim yang berakibat pada lebih kompaknya molekul enzim dan karenanya bersifat lebih tahan selama penyimpanan. Walaupun gliserol dilaporkan efektif di dalam mempertahankan aktivitas beberapa enzim (Mosan dan Combess, 1984, Schwimmer, 1981), senyawa trihidroksi alkohol ini cenderung menurunkan aktivitas protease *B. stearothermophillus.*

Logam Co yang ditambahkan dalam bentuk $CoCl_2$ juga dapat memperpanjang masa simpan enzim hingga hari ke-35, tetapi aktivitasnya telah menurun banyak hingga 0,01 U/ml berarti hanya 16,9% dari aktivitas enzim kontrol.

Protease *Bacillus stearothermophilus* telah dilaporkan termasuk protease logam (Feder dan Shuck, 1970, Priest, 1977), yaitu enzim yang keaktifannya tergantung pada adanya logam. Berbagai logam divalen Ca, Co, Mn dan Zn dapat meningkatkan aktivitas protease *B. stearothermophillus*, (percobaan sebelumnya di laboratorium kami). Amonium sulfat merupakan senyawa kimia yang umum digunakan untuk memekatkan (mengkonsentrasikan) filtrat enzim hasil fermentasi sehingga diperoleh aktivitas yang lebih tinggi (Halpern, 1981). Setelah mengalami proses penggumpalan oleh 70% amonium sulfat, aktivitas enzim yang dilarutkan kembali di dalam buffer fosfat 0,02 M meningkat menjadi 0,247 U/ml. Terhadap enzim yang digumpalkan ini, ditambahkan aditif yang sama seperti sebelum mengalami proses penggumpalan. Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa enzim kontrol bersifat lebih tahan simpan. Namun demikian penambahan aditif malah merusak aktivitas enzim.

Pengaruh negatif dari aditif (termasuk sorbitol) yang ditambahkan pada enzim pekat ini terhadap daya simpan enzim, diperkirakan karena aditif yang ditambahkan bereaksi dengan protein enzim yang sudah mempunyai konformasi yang lebih kaku setelah proses "salting out", oleh penambahanamonium sulfat sehingga menurunkan interaksi elektrostatik diantara molekul protein enzim itu sendiri. Akibatnya terjadi kehilangan aktivitas enzim.

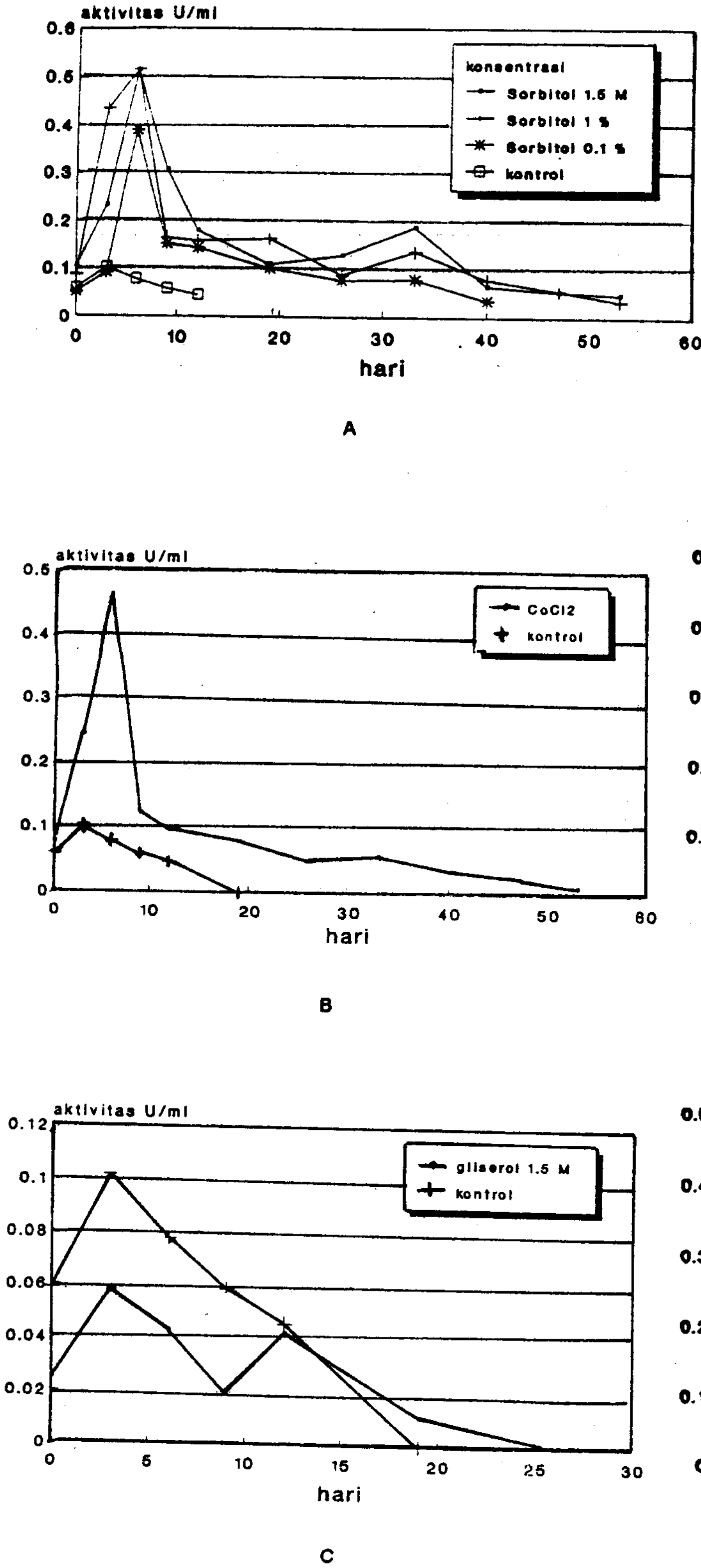
Stabilitas Protease *Bacillus subtilis*

Enzim kontrol (tanpa penambahan aditif) aktivitasnya hanya terlihat hingga hari ke-32. Penambahan aditif baik sorbitol 1%, $CoCl_2$ 2mM, $MnCl_2$ 2 mM, maupun amonium sulfat 20%, 30% dan 70% ternyata dapat memperpanjang masa simpan protease sampai lebih dari dua bulan (Gambar 4 dan 5). Dengan penambahan sorbitol 1%, aktivitas protease masih terlihat hingga hari ke-75 sebesar 38,8% dari aktivitas awalnya. Penambahan amonium sulfat juga terlihat efektif dalam memperpanjang masa simpan enzim. Seperti halnya dengan sorbitol, amonium sulfat dapat menarik mantel air dari lingkungan molekul enzim sehingga menimbulkan konformasi enzim yang lebih baku dan tidak mudah membuka, atau tidak mudah rusak (Wiseman, 1978, Schwimmer, 1981). Amonium sulfat dilaporkan efektif di dalam menjaga kestabilan isositrat dehidrogenese (Wiseman, 1978).

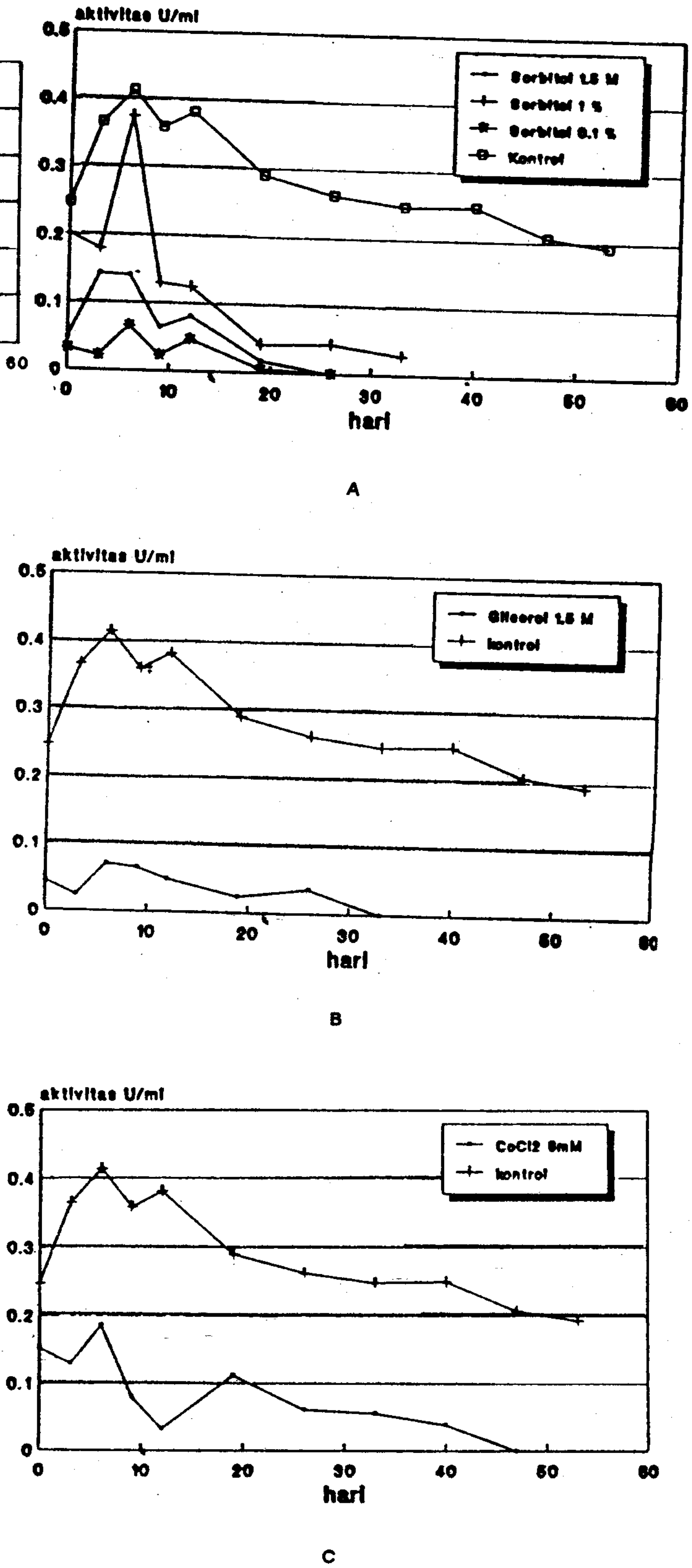
Logam Co yang ditambahkan dalam bentuk $CoCl_2$ mampu memperpanjang masa simpan protease hingga hari ke-75, walaupun aktivitasnya telah menurun hingga 20,8% dibandingkan dengan aktivitas awal. Logam Mn yang ditambahkan mampu memperpanjang masa simpan protease. Sampai dengan hari ke-61, aktivitasnya masih 37,7% jika dibandingkan dengan aktivitas awalnya.

Bacilus subtilis menghasilkan beberapa macam enzim, diantaranya protease yang termasuk dalam golongan protease logam (Priest, 1977). Diduga garam anorganik Co dan Mn yang ditambahkan memberikan pengaruh positif terhadap kestabilan enzim dengan cara menetralkan kelebihan muatan elektrostatik yang melindungi molekul enzim sehingga konformasi enzim dapat dipertahankan.

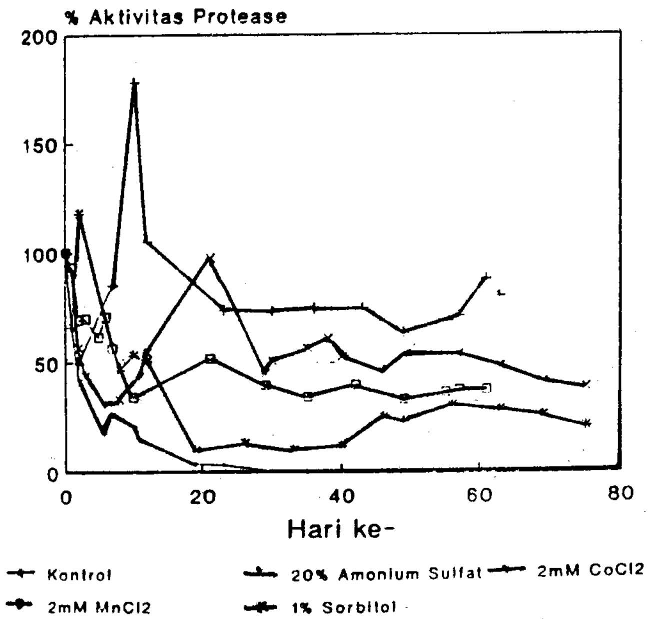
Menurut Schwimmer (1981) ion Mn^{2+} dapat menstabilkan lisozim; ion Mn^{2+} dan ion Cd^{2+} telah mendapat paten sebagai pelindung enzim L-arginase selama pemurnian dan penyimpanan, Ion Co juga meningkatkan kestabilan panas glukoseisomerase.



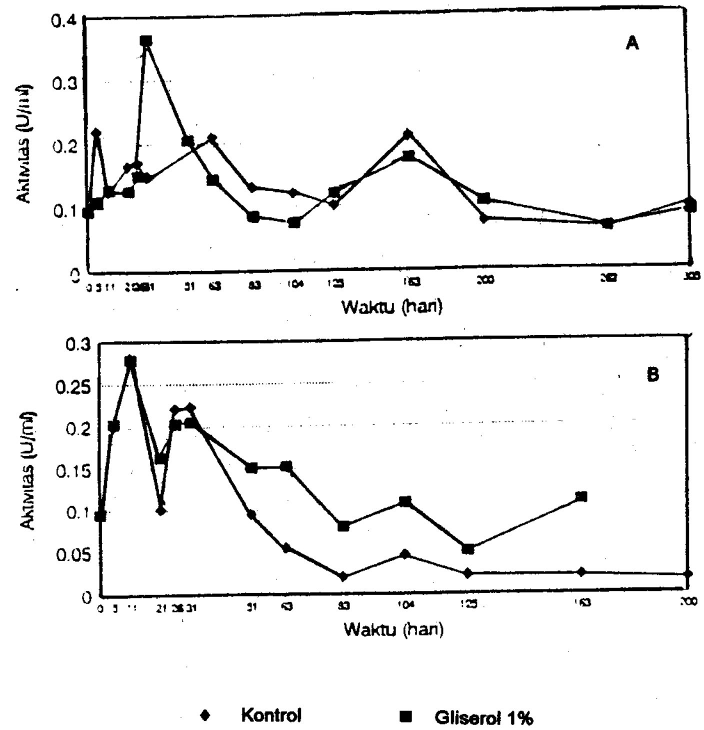
Gambar 2. Pengaruh sorbitol (A) gliserol (B) dan $CoCl_2$ (C) terhadap stabilitas filtrat protease *Bacillus stearothermophilus*



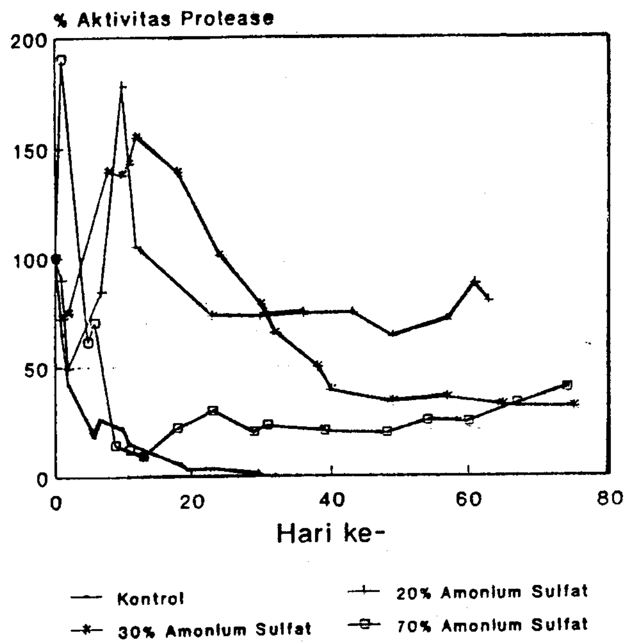
Gambar 3. Pengaruh aditif terhadap stabilitas protease *B. stearothermophilus* setelah penambahan amonium sulfat 70%



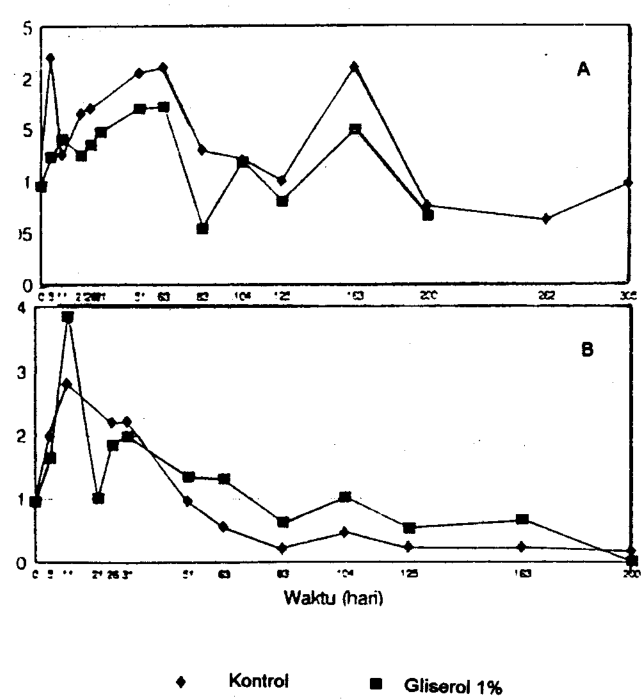
Gambar 4. Pengaruh aditif terhadap stabilitas filtrat protease *B. subtilis*



Gambar 6. Pengaruh sorbitol (1%) terhadap stabilitas protease *B. licheniformis* selama penyimpanan suhu 4- 10 °C (A) dan suhu kamar (B)



Gambar 5. Pengaruh berbagai konsentrasi amonium sulfat terhadap stabilitas filtrat protease *B. subtilis*



Gambar 7. Pengaruh gliserol terhadap stabilitas protease *B. licheniformis* selama penyimpanan suhu 10°C (A) dan suhu kamar (B)

Stabilitas Protease *B. licheniformis*

Di dalam percobaan pendahuluan diperoleh hasil bahwa protease *B. licheniformis* mencapai aktivitas tinggi apabila ditumbuhkan pada media limbah cair tahu dengan suplementasi glukosa 2%. Selanjutnya media ini digunakan di dalam menghasilkan filtrat protease untuk percobaan penyimpanan. Selama penyimpanan, aktivitas protease yang dihasilkan berkisar pada 0,089 unit/ml sampai 0,28 U/ml. Berbeda dengan filtrat protease yang dihasilkan oleh protease *B. stearothermophilus* dan *B. subtilis*, protease *B. licheniformis* yang dihasilkan ternyata sangat stabil. Oleh karena itu untuk protease *B. licheniformis* percobaan penyimpanan dilakukan pula pada suhu kamar. Pada penyimpanan suhu kamar, aktivitas enzim masih dapat dipertahankan sampai lebih dari 2 bulan penyimpanan. Kemungkinan adanya sisa glukosa yang juga merupakan senyawa polihidroksi alkohol di dalam filtrat protease turut menjaga kestabilan enzim selama penyimpanan selanjutnya. Pada suhu dingin, enzim bersifat lebih stabil dan tahan sampai 10 bulan penyimpanan. Serupa halnya dengan pada protease *B. stearothermophillus* yang sudah digumpalkan oleh amonium sulfat dan karenanya cukup stabil (Gambar 3). Terhadap protease yang sudah stabil, aditif tidak terlalu efektif, dan setelah 30 hari penyimpanan pada 4-10°C pengaruh logam Co, Mn dan Ca menjadi sedikit destruktif walaupun Mn pada awal percobaan masih sedikit efektif. Agaknya adanya glukosa dalam filtrat yang dapat menarik air, sudah membuat struktur enzim menjadi lebih kaku (Schwimmer, 1981). Seperti halnya dengan protease *B. stearothermophilus* apabila terhadap struktur tersebut ini ditambahkan lagi senyawa yang dapat menganggu "kekakuan" (karena meningkatkan interaksi elektrostatik), pengaruhnya menjadi kurang nyata bahkan menjadi sedikit destruktif (Gambar 3).

Kinetika Protease *Bacillus sp* dan Pengaruh Aditif

Telaah kinetika enzim dalam beberapa kasus dapat membantu menjelaskan mekanisme reaksi beberapa inhibitor dan aktivator enzim. Oleh karena ini di dalam percobaan ini dianalisis pengaruh aditif terhadap beberapa parameter kinetika protease. Parameter Km dan Vmaks *Bacillus subtilis* dan *B. stearothermophilus* dihitung dari transformasi linear persamaan Michaelis Menten, (persamaan Lineweaver Burk).

Tabel 2 tidak menunjukkan adanya pola yang berkaitan antara perubahan parameter kinetika (Km dan Vmax) dengan efektivitas aditif. Pada protease *Bacillus subtilis* sorbitol dan aditif lain umumnya meningkatkan nilai Km (kecuali amonium sulfat 70%) dan meningkatkan Vmaks atau tidak mengubahnya. Pada protease *Bacillus stearothermophilus*, sorbitol dan $CoCl_2$ yang efektif terhadap daya simpan protease bahkan menurunkan Km dan sedikit meningkat Vamks.

Tabel 2. Pengaruh aditif terhadap parameter kinetika *Bacillus sp.*

Jenis aditif	Km (%)	Vmaks (IU/ml)
Bacillus subtilis		
Kontrol	0,28	0,012
Sorbitol	0,57	0,009
Co	1,53	0,020
Mn	1,55	0,028
Amonium sulfat 30%	0,52	0,050
Amonium sulfat 70%	0,18	0,010
Bacillus stearothermophylus		
Kontrol	0,77	0,080
Sorbitol 1%	0,65	0,129
Co	0,46	0,114

KESIMPULAN

Sorbitol (1%), gliserol (1%), kobalt (2 mM) dan amonium sulfat (20-70%) cukup efektif di dalam menjaga kestabilan enzim protease *Bacillus stearothermophillus* dan *B. subtilis* yang relatif kurang tahan simpan.

Filtrat pekat *B. stearothermophillus* yang dihasilkan setelah penggumpalan oleh 70% amonium sulfat lebih stabil selama penyimpanan. Terhadap filtrat pekat ini, penambahan aditif bersifat destruktif.

Protease *B. licheniformis* yang difermentasikan dengan menggunakan limbah cair tahu dan 2% glukosa sangat stabil selama penyimpanan suhu dingin. Sorbitol (1%) dan gliserol (1%) terlihat efektif pada penyimpanan suhu kamar, dimana enzim kurang begitu stabil.

DAFTAR PUSTAKA

Aunstrup, K. 1979. Production, isolation and ecocomicof extracellular enzymes. *Di dalam* L.B. Wingard, E. Katchalski-katsir dan L. Goldstein (eds.). Applied Biochem. and Bioengin. Vol : II. Academic Press, New York.

Bergmeyer, H.U. dan M.G. Grassl. 1983. Methods of Enzymatic Analysis vol: II. Verlag Chemie, Weinheim.

√ Feder, J. dan J.M. Schuck. 1970. Studies on the *Bacillus subtilis* neutral protease and *Bacillus thermoproteolyticus* thermolysin-catalyzed hydrolisis of dipeptide substrates. J. Biochem.. 9 (14):2784-2790.

Halpern, M.G. 1981. Industrial Enzymes from Microbial Sources-recent Advences. Noyes Data Corporation, New Jersey.

Monsan, P. dan D. Combess. 1984. Stabilization of Enzyme Activity. The Proceedings of Biotechnology '84 Europe online 1984. Published by online Publications, Ltd., London.

Priest, F.G. 1977. Extracellular Enzymes Synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriological Rev. 41(3):711.

Schwimmer, S. 1981. Source Book of Food Enzymology. AVI Publishing Co., Inc., Connecticut.

Stanbury, P.F. dan A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, Ltd., Oxford.

Ward, O.P. 1983. Proteinase. *Di dalam* Microbial and Enzyme Biotechnology. (W.M. Fogarty eds.) Applied Science Publisher, New York.

Wiseman, A. 1978. Stabilization of Enzymes. *Di dalam* A. Wiseman (ed.). Topics in Enzymes and Fermentation Biotechnology vol 2. John Willey and Sons, New York.

Yamamoto, A. 1975. Proteolytic Enzyme. Di dalam Enzymes in Food Processing (G. Reed eds.). Academic Press. New York.