

Produksi dan Karakterisasi Parsial Protease Alkali Termostabil *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01

Production and Partial Characterization of Thermostable Alkaline Protease from Bacillus thermoglucosidasius AF-01

ASRUL MUHAMAD FUAD^{1*}, RINI RAHMAWATI² & NISA RACHMANIA MUBARIK²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

²Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Bacillus thermoglucosidasius AF-01, isolated from a traditional tofu waste at Ciampea - Bogor, produced a potentially thermostable alkaline protease. Maximum activity reached 132 U/ml using glucose or starch as carbon source in shake flask fermentation. Its activity was higher than those produced by reference isolates such as *B. licheniformis* (113 U/ml) or *B. stearothermophilus* (84 U/ml). Protease production using Durham's media reached its maximal production at 124.6 U/ml after 27 hours of fermentation in a 1l fermentor under controlled pH and temperature (pH 9.0 and 45 °C). Protease from AF-01 might be a metalloprotease. Its activity was inhibited by the presence of EDTA but was not inhibited by other protease inhibitors such as PMSF or PCMB. It was revealed that some metal ions such as Cu²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, or Zn²⁺ increased the enzyme activity, whereas some others such as K⁺, Na⁺, dan Mn²⁺ decreased its activity. The activity was not affected by Co²⁺ ion and the presence of SDS up to 0.4% (w/v). However, enzyme activity was reduced in the presence of 0.5% (w/v) of SDS. The optimum pH and temperature of the enzyme activity were 9.0 and 80 °C respectively. Thermostability assay revealed that the enzyme was relatively stable at 80 °C up to 12 hours in which the enzyme retained 60% of its initial activity. Bacterial identification showed that the isolate AF-01 was belong to *Bacillus*. Further identification employing the BIOLOG system revealed that the isolate had similarity (0.269) to *B. thermoglucosidasius*.

Key words: Alkaline protease, thermostable, metalloprotease, *Bacillus thermoglucosidasius*

Protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam dunia industri. Secara komersial protease menduduki urutan tertinggi di antara enzim lainnya dan mencakup lebih dari 60% total penjualan enzim atau sekitar 600 juta US\$ (Rao *et al.* 1998). Produksi protease hampir mencapai 500 ton/tahun (Crueger & Crueger 1984). Nilai impor protease di dunia terus meningkat, sementara itu kebutuhan protease di Indonesia hampir 100% berasal dari impor. Protease banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi, detergen, pengolahan pangan seperti susu, keju, roti, produk kedelai, protein hidrolisat, dan sintesis aspartam. Protease juga dimanfaatkan dalam industri kulit dan sutera.

Protease dapat dihasilkan dari berbagai sumber, seperti hewan (pepsin, renin), tumbuhan (papain, bromelin), dan mikroba. Namun secara komersial, mikroba merupakan sumber yang baik penghasil protease. Selain karena sumbernya beragam, protease asal mikroba dapat diproduksi dalam jumlah yang besar dan waktu yang singkat dengan biaya produksi relatif murah. Protease dari mikroba umumnya bersifat ekstraseluler sehingga penanganan proses hilirnya jauh lebih mudah. Salah satu mikroba penghasil protease yang telah banyak diteliti ialah *Bacillus* yang juga penghasil berbagai jenis enzim lainnya. Protease

dari *Bacillus* banyak digunakan dalam industri makanan dan detergen. Sebagai contoh subtilisin yang tersedia secara komersial merupakan protease alkalin yang diproduksi oleh *B. subtilis*.

Industri detergen memerlukan enzim dengan kisaran pH tinggi, rentang suhu luas, dan stabil terhadap berbagai senyawa yang terkandung dalam detergen. Oleh karena itu, sumber baru yang potensial dengan karakteristik enzim yang diinginkan perlu dicari. Enzim termostabil sudah dikenal dalam berbagai aplikasi bioteknologi. Stabilitas yang tinggi dari suatu enzim terhadap suhu tinggi atau terhadap senyawa penghambat memungkinkan enzim tersebut dapat bekerja secara efektif (fungsional), sementara enzim lainnya tidak dapat berfungsi dengan baik. Meskipun tidak ada alasan yang cukup kuat untuk mengatakan bahwa enzim termostabil harus selalu berasal dari organisme termofil, tetapi umumnya protein termostabil didapatkan dari organisme tersebut (Rahman *et al.* 1994). Beberapa jenis *Bacillus* dilaporkan mampu memproduksi enzim yang tahan terhadap cekaman pH dan suhu. Dhandapani dan Vijayaragavan (1994) telah meneliti protease alkalin termostabil dari *B. stearothermophilus* AP-4. Banerjee *et al.* (1999) juga mempelajari termostabilitas dan ion logam terhadap protease alkalin termostabil dari *B. brevis*. *Bacillus* sp. No 58 yang termofil diketahui mampu memproduksi protease alkalin dengan aktivitas terbaik pada rentang pH 10.0-11.5 (Fuad 2002).

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-21-8754587,
Fax. +62-21-8754588, E-mail: asrul@lipi.go.id

Bacillus galur AF-01 diketahui memiliki aktivitas proteolitik yang cukup tinggi pada kisaran pH alkali. Bakteri ini tergolong termofil karena kemampuannya untuk tumbuh pada suhu relatif tinggi, yaitu 55 °C. Penelitian ini bertujuan mendapatkan kondisi terbaik produksi protease alkali AF-01 dalam kultur cair dan memperoleh informasi beberapa karakteristik fisiko-kimia dari enzim protease tersebut.

BAHAN DAN METODE

Bahan. *Bacillus* sp. galur AF01 merupakan koleksi laboratorium Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yang diperoleh dari limbah cair tahu di daerah Ciampea, Bogor. *B. licheniformis* merupakan koleksi kultur Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dan *B. stearothermophilus* berasal dari koleksi kultur Shigenori Kanaya (Lab. Extremophiles, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japan).

Identifikasi Isolat. Identifikasi galur AF-01 dilakukan dengan pewarnaan Gram, pengujian suhu tumbuh, konsentrasi garam, penggunaan beberapa jenis sumber karbon, dan uji sistem BIOLOG (Biolog 1993), yaitu uji sidik jari penggunaan berbagai sumber karbon. Sistem uji ini terdiri atas 96 sumur reaksi pengujian biokimia. Biakan yang akan diamati ditumbuhkan pada media *biolog universal media* glukosa (BMUG) + 1% (b/v). Sebanyak 1 lup biakan disuspensikan dalam garam fisiologi (NaCl 0.85%), lalu diinkubasi pada suhu 35 °C. Suspensi kultur diteteskan ke dalam sumur *microplate* masing-masing 150 µl, kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu 35 °C. Setiap sumur memiliki indikator pewarna tetrazolium. Reaksi dikatakan positif apabila isolat uji menggunakan sumber karbon tersebut dan terjadi perubahan warna menjadi ungu. Pola dan intensitas warna yang dihasilkan selanjutnya dianalisis dalam program dan pangkalan data yang tersedia dalam instrumen BIOLOG.

Peremajaan Kultur, Inokulum dan Media Produksi. Biakan mikrob disimpan dan diremajakan pada media agar-agar nutrisi (Difco). Sebanyak 5% (v/v) inokulum berumur 24 jam ($OD_{600} = 1.3$) diinokulasikan ke dalam media produksi yang memiliki komposisi yang sama dengan media untuk inokulum. Media produksi ialah media Durham (Durham *et al.* 1987) yang dimodifikasi unsur kelumitnya. Komposisi media produksi per liter ialah 10 g tepung pati singkong, 5 g baktio pepton (Difco), 5 g ekstrak khamir (Oxoid), 2 g KH_2PO_4 , 2.5 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 5 ml larutan kelumit A (2.0 g $CaCO_3$, 0.406 g ZnO , 5.4 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.99 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.17 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.238 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.062 g H_3BO_3 , 5.625 ml HCl pekat), 5 ml larutan kelumit B (10.0 g MgO dan 19.106 ml HCl pekat dalam), 0.1 ml larutan kelumit C (24.1 ml $Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$). Larutan kelumit disterilkan secara terpisah (121 °C, 15 menit). Penambahan larutan kelumit dan pengaturan pH dilakukan secara aseptik setelah media steril. Media yang sama dengan menggunakan sumber karbon glukosa (10 g/l) dan media kaldu nutrisi (Difco) digunakan sebagai media pembanding.

Uji Pengaruh pH dan Suhu terhadap Produksi Protease.

Uji pengaruh pH awal media terhadap pertumbuhan sel dan produksi protease menggunakan media Durham dengan sumber karbon pati dalam fermentasi labu kocok (75 ml media

dalam labu Erlenmeyer 250 ml), 150 rpm, 37 °C selama 42 jam, pengambilan cuplikan setiap 6 jam, dan 2 ulangan. Kisaran pH uji ialah 7.0, 8.0, 9.0, dan 9.5. Pengaruh suhu terhadap produksi protease dilakukan dalam fermentor skala 1 liter (volume kerja 750 ml) dengan pH optimum dan suhu terkontrol (37, 45, 50, dan 55 °C), agitasi 150 rpm, aerasi 1 vvm, 30 jam, dan pengambilan cuplikan setiap 3 jam. Kontrol pH dilakukan dengan penambahan larutan HCl 1M atau NaOH 1 M steril.

Uji Aktivitas Proteolitik dan Kandungan Protein.

Aktivitas proteolitik protease diukur menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi (Fujiwara *et al.* 1993). Sebanyak 0.5 ml substrat kasein (0.6% b/v) kasein dalam bufer Tris-HCl 0.1 M (pH 9.0) diprincubasi pada suhu 60 °C selama 5 menit. Reaksi enzim dimulai dengan menambahkan 0.1 ml larutan enzim ke dalam substrat dan diinkubasi pada suhu 60 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0.5 ml larutan TCA (asam trikloroasetat 0.11 M, natrium asetat 0.22 M, asam asetat 0.33 M) dalam keadaan dingin. Campuran uji dibiarkan mengendap selama 30 menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9520 g (10 000 rpm, diameter rotor 17 cm), 4 °C selama 15 menit. Peptida terlarut dalam supernatan hasil hidrolisis dibaca secara spektrometri pada $\lambda = 275$ nm. Untuk kontrol, dilakukan penambahan larutan TCA selanjutnya larutan enzimnya. Larutan tirosina (0-100 µg/ml) digunakan sebagai standar untuk pengukuran aktivitas proteolitik. Satu unit aktivitas protease (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 µg tirosina (ekuivalen)/menit/ml larutan enzim dari substrat kasein pada kondisi pengujian tersebut. Kandungan protein diuji dengan metode Bradford (1976) dan menggunakan larutan BSA (0-1 mg/ml) sebagai standar.

Produksi Protease. Waktu optimum produksi protease *Bacillus* sp. AF-01 ditentukan berdasarkan pada kurva pertumbuhan sel dan produksi protease AF-01 pada kondisi pH dan suhu optimumnya. Produksi protease dilakukan dalam fermentor skala 1 liter dengan 750 ml media produksi menggunakan sumber karbon glukosa atau pati dan inokulum 5% (v/v) umur 18-24 jam. Pengambilan cuplikan dilakukan setiap tiga jam. Cairan fermentasi dipisahkan dari biomassa dengan sentrifugasi (9520 g, 15 menit, 4 °C).

Preparasi Contoh Protease Semimurni. Sebanyak 500 ml cairan fermentasi bebas sel (dengan substrat glukosa) dipekatkan dengan filtrasi tangensial (ukuran pori 10 kDa) sampai volume 200 ml (2.5 kali pekat) dalam ruang dingin (4 °C). Larutan enzim pekat selanjutnya diendapkan dengan penambahan amonium sulfat secara bertahap: 20%, 50%, 70%, dan 80% S (saturasi). Pada akhir setiap tahap, campuran disentrifugasi pada kecepatan 9520 g, 30 menit, 4 °C. Supernatan dipisahkan dan dilanjutkan dengan penambahan amonium sulfat tahap berikutnya, sementara endapan protein dilarutkan kembali dalam volume minimal dengan bufer Tris-HCl 100 mM pH 9.0. Contoh enzim pekat hasil pengendapan dikumpulkan kemudian dilakukan pada kolom Sephadex G-25 (volume kolom 8-10 ml) untuk penghilangan garam.

Karakterisasi Parsial Protease Ekstraselluler. Pengaruh pH terhadap aktivitas proteolitik dilakukan pada kisaran pH 5.0-12.0. Sistem bufer yang digunakan ialah bufer sitrat-fosfat

(pH 5.0-7.0), bufer Tris-HCl (pH 8.0-9.0), dan bufer borat-NaOH (pH 10.0-12.0). Pengaruh suhu diuji pada kisaran 30-90 °C dengan interval 10 °C. Pengaruh beberapa ion logam diuji dengan penambahan ion K⁺(KCl), Na⁺(NaCl), Cu²⁺(CuCl₂), Co²⁺(CoCl₂·6H₂O), Mn²⁺(MnSO₄·H₂O), Mg²⁺(MgSO₄·H₂O), Zn²⁺(ZnSO₄·7H₂O), dan Ca²⁺(CaCl₂·2H₂O) dengan konsentrasi masing-masing sebesar 5 mM. Beberapa senyawa inhibitor protease juga diuji seperti Etilendiaminatetra-asetat (EDTA) 2.5 dan 10 mM, fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF) 1 dan 5 mM, p-kloro merkuri asam benzoat (PCMB) 1 dan 5 mM, dan pengaruh senyawa detergen sodiumdodesil-sulfat (SDS) dengan konsentrasi akhir 0.1-0.5% (b/v).

Uji Stabilitas Enzim terhadap Panas. Uji stabilitas enzim terhadap panas dilakukan dengan menginkubasikan larutan enzim pada suhu 80 °C dan pH optimumnya (pH 9.0) selama 12 jam. Pengambilan cuplikan dilakukan pada satu jam pertama dan setiap tiga jam. Aktivitas tersisa diuji dengan metode seperti dijelaskan sebelumnya.

HASIL

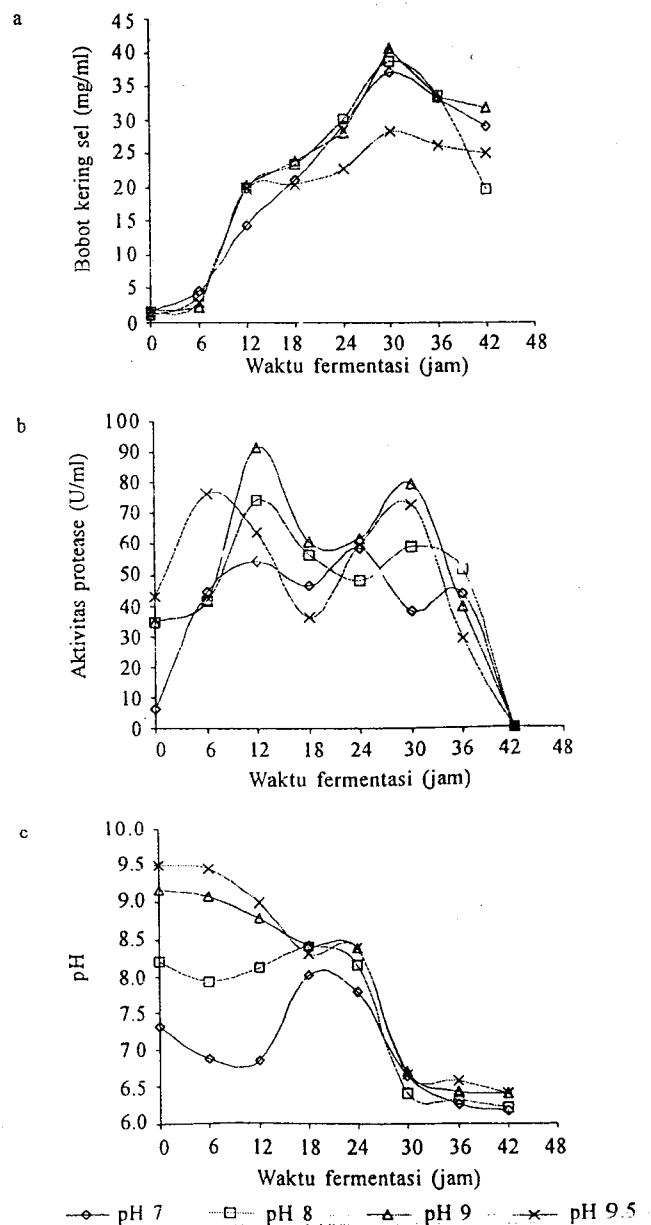
Identifikasi Isolat. Uji konvensional yang dilakukan terhadap galur AF-01 menunjukkan bahwa isolat tersebut ialah *Bacillus* (Tabel 1). Uji lanjut menggunakan sistem BIOLOG menunjukkan bahwa galur AF-01 memiliki nilai kemiripan sebesar 0.269 dengan *B. thermoglucosidarius*.

Pengaruh pH dan Suhu terhadap Pertumbuhan Sel dan Produksi Protease. Secara umum fase stasioner galur AF-01 dicapai mulai jam ke-12 sampai jam ke-30 (Gambar 1). Sepanjang

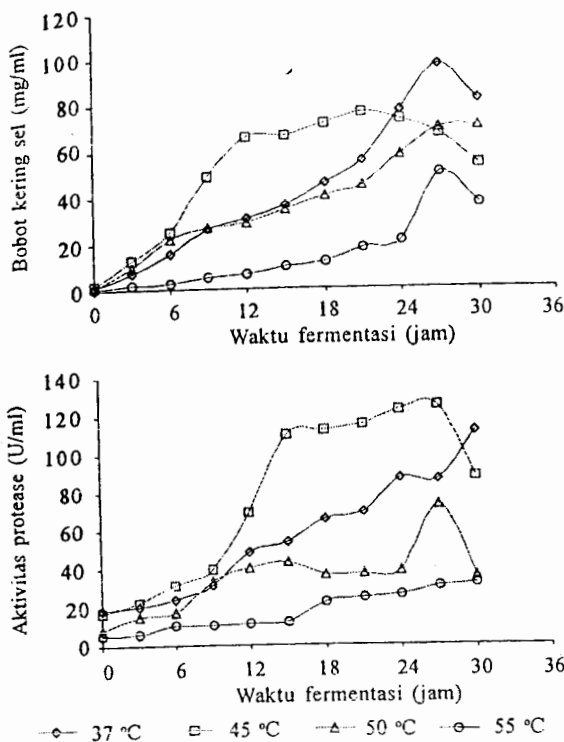
proses fermentasi, nilai pH media berubah mendekati pH 8.0 saat fase stasioner tercapai dan terus turun sampai pH di bawah 7.0 pada akhir fase stasioner. Sementara produksi protease secara umum juga dipengaruhi oleh pH awal media. Produksi protease tertinggi terlihat pada media dengan pH awal 9.0, yaitu 91.79 U/ml. Pengujian dilakukan pada pH media konstan (9.0) dengan suhu 37, 45, 50, dan 55 °C. Suhu 45 °C merupakan suhu optimum untuk produksi protease (Gambar 2b). Meskipun produksi biomassa lebih tinggi pada suhu 37 °C di akhir fase stasioner, tetapi laju pertumbuhan spesifik lebih tinggi pada suhu 45 °C ($\mu_{maks} = 0.163 \text{ jam}^{-1}$) dibandingkan dengan suhu 37 °C ($\mu_{maks} = 0.114 \text{ jam}^{-1}$).

Tabel 1. Uji identifikasi morfologis dan fisiologis terhadap isolat AF-01

Jenis uji	Hasil
Bentuk sel	Batang
Gram	+
Pembentukan spora	+
Motilitas	+
Penampilan di cawan	Menyebar, flat, putih
Suhu tumbuh	
37 °C	+
50 °C	+
55 °C	+
65 °C	-
Lingkungan tumbuh	
Anaerob	-
NaCl 7%	+
Uji enzim	
Urease	+
Katalase	+
Protease	+
Amilase (hidrolisis pati)	+
Nitrit > nitrat (reduksi)	+
Uji fermentasi karbon	
Glukosa	+
Sitrat	+
Manitol	+
Arabinosa	+
Xilosa	-
Uji lain	
Voges Proskauer	+
Indol	-
Metil merah	-



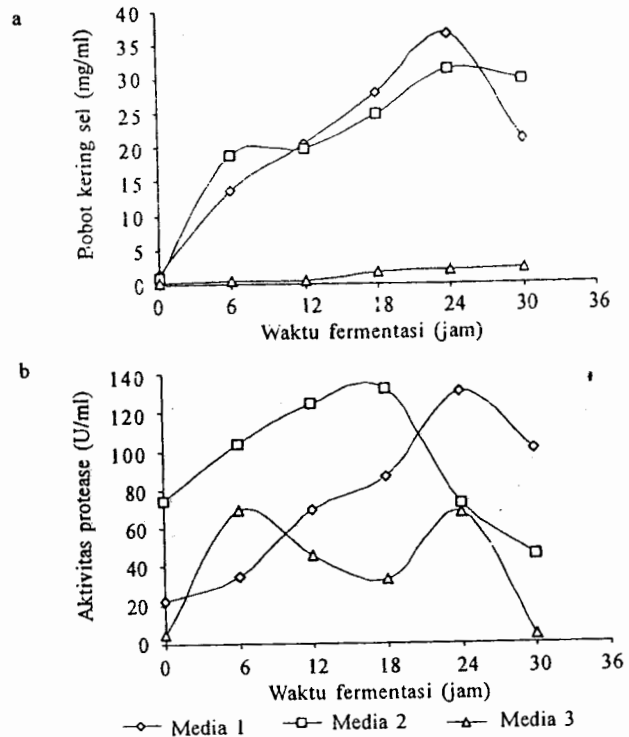
Gambar 1. Profil kurva pertumbuhan sel (a), kurva produksi protease (b) dan kurva perubahan pH (c) dari *B. thermoglucosidarius* AF-01 pada media produksi dengan pH awal berbeda, dikultur tabu kocok pada suhu 37 °C, agitasi 150 rpm selama 42 jam.



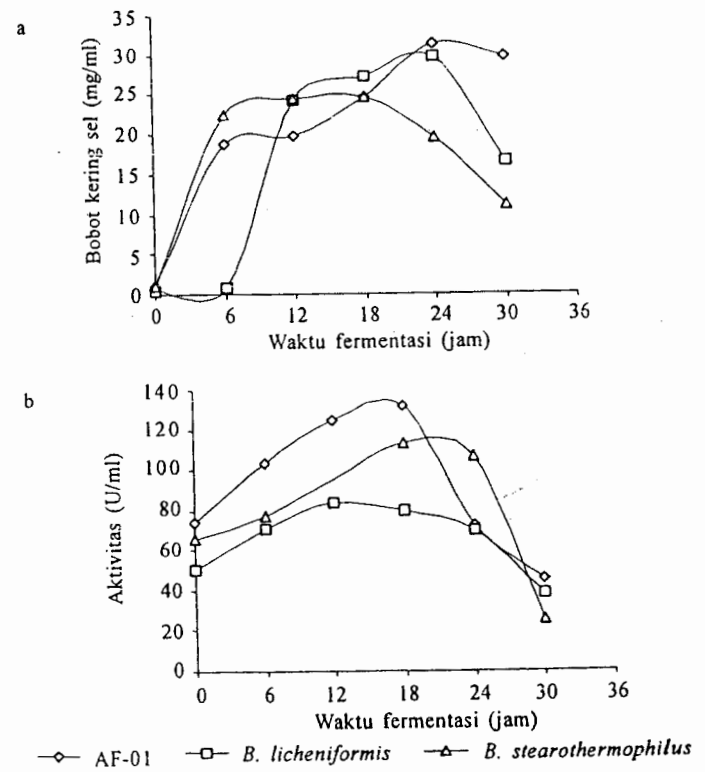
Gambar 2. Profil kurva pertumbuhan sel (a) dan kurva produksi protease (b) dari *B. thermoglucosidasius* AF-01 pada media produksi dengan suhu berbeda, dikultur dalam fermentor (750 ml media produksi) pada pH 9.0 (konstan), agitasi 150 rpm, aerasi 1 vvm selama 30 jam.

Uji Produksi Protease *B. thermoglucosidasius* AF-01 terhadap Isolat Acuan dan Media Berbeda. Pertumbuhan sel *thermoglucosidasius* AF-01 terlihat relatif lebih tinggi dalam media yang mengandung pati (36.40 mg/ml) sebagai sumber karbon dibandingkan dengan yang mengandung glukosa (31.39 mg/ml) dan jauh lebih tinggi dibandingkan dengan media kaldu nutrisi tanpa sumber karbon tambahan (1.85 mg/ml) (Gambar 3). Sementara itu aktivitas maksimal protease yang diproduksi unik yang menggunakan pati maupun glukosa sebagai sumber karbon hampir sama, masing-masing sebesar 131.7 U/ml dan 130.3 U/ml dengan waktu produksi maksimal berbeda, yaitu 18 jam dan 24 jam. Perbandingan kemampuan produksi protease ini dilakukan pada suhu dan pH optimal galur AF-01 (45 °C dan pH awal media 9.0) dalam kultur labu kocok. Sementara itu produksi maksimal protease AF-01 relatif lebih tinggi daripada yang diproduksi oleh isolat acuan *B. licheniformis* maupun *B. stearothermophilus*, masing-masing sebesar 131.7 U/ml, 84.1 U/ml dan 113.2 U/ml, meskipun pertumbuhan sel ketiga isolat tersebut hampir sama (Gambar 4).

Produksi Protease dalam Fermentor. Produksi protease dilakukan dalam fermentor skala 1 liter menggunakan 750 ml media produksi dengan pati atau glukosa sebagai sumber karbon. Berbeda dengan labu kocok, fermentasi dalam fermentor dilakukan pada pH dan suhu optimum (9.0, 45 °C) yang dijaga konstan. Produksi maksimal enzim protease yang dicapai dengan substrat pati dan glukosa masing-masing 124.6 U/ml (27 jam) dan 57.7 U/ml (24 jam) (data tidak ditampilkan). Fermentasi dengan substrat pati ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 3. Profil kurva pertumbuhan sel (a) dan kurva produksi protease *B. thermoglucosidasius* AF-01 media Durham dengan sumber karbon pati (media 1), glukosa (media 2), dan media kaldu nutrisi tanpa sumber karbon tambahan (media 3).



Gambar 4. Profil kurva pertumbuhan sel (a) dan kurva produksi protease (b) dari isolat *Bacillus* sp. AF-01 dan dua isolat acuan yaitu *B. licheniformis* dan *B. stearothermophilus* dalam kultur labu kocok dengan media Durham (sumber karbon glukosa), 45 °C, pH awal 9.0, 150 rpm, 30 jam.

Purifikasi Parsial Protease. Cairan fermentasi bebas sel dengan substrat glukosa dipanen pada waktu optimalnya sebagai sumber enzim untuk purifikasi dan karakterisasi parsial.

Aktivitas enzim kasar yang diperoleh pada fermentasi dalam fermentor dengan menggunakan substrat glukosa jauh di bawah nilai aktivitas yang dapat diproduksi dengan substrat pati (Gambar 5). Aktivitas awal dari enzim kasar sebelum pengendapan dengan amonium sulfat 33.04 U/ml (berkurang dari aktivitas awal karena faktor denaturasi akibat penyimpanan contoh dan prefiltrasi yang dilakukan sebelum dilakukan ultrafiltrasi). Setelah pemekatan melalui ultrafiltrasi diperoleh peningkatan aktivitas menjadi 49.44 U/ml diikuti dengan peningkatan aktivitas spesifik (Tabel 2). Pada saat fraksinasi bertahap dengan amonium sulfat terjadi penurunan aktivitas spesifik pada semua perlakuan. Meskipun demikian, contoh enzim protease pada fraksi 50% dan 70% S menunjukkan aktivitas spesifik yang relatif tinggi (masing-masing 1.21 U/mg dan 1.40 U/mg). Kedua fraksi ini digunakan sebagai sumber enzim untuk karakterisasi dan dimasukkan ke dalam kolom *Desalting Sephadex G-25*. Fraksi no. 2-9 (8 ml) yang mengandung protein kemudian dikumpulkan (data tidak ditampilkan) untuk uji karakterisasi lebih lanjut.

Karakterisasi Parsial Protease. pH optimum aktivitas protease *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01 ialah pH 9.0, sedangkan suhu optimumnya 80 °C (Gambar 6).

Ion logam Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , dan Mg^{2+} memberikan efek positif terhadap aktivitas protease AF-01. Ion logam Mn^{2+} , Na^+ , dan K^+ memberikan efek negatif, sedangkan ion Co^{2+} tidak berpengaruh terhadap aktivitas protease AF-01 (Gambar 7a). Sementara itu penambahan SDS terlihat menurunkan aktivitas

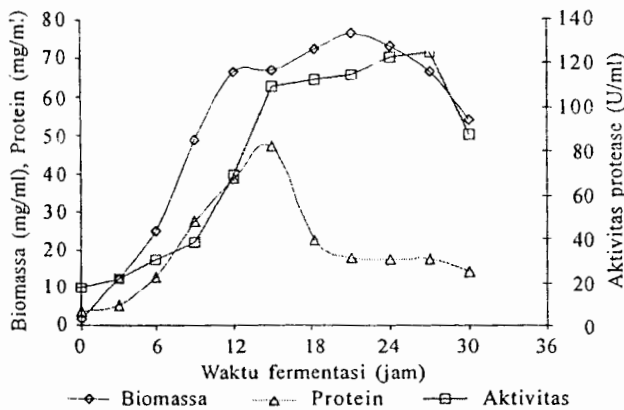
enzim pada konsentrasi final 0.5% (b/v), tetapi tidak berpengaruh pada konsentrasi yang lebih rendah (Gambar 7b). Sedangkan EDTA merupakan senyawa inhibitor yang secara nyata menghambat aktivitas enzim (Gambar 7c).

Uji stabilitas enzim terhadap suhu menunjukkan bahwa protease AF-01 masih mempertahankan aktivitasnya sebesar 60% setelah diinkubasi pada suhu 80 °C selama 12 jam (Gambar 7d).

PEMBAHASAN

Pertumbuhan suatu mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti faktor fisika-kimia (suhu, pH, aerasi, agitasi) dan komposisi media tumbuh (Stanbury & Whitaker 1984). *B. thermoglucosidasius* AF-01 menunjukkan pH dan suhu optimum untuk pertumbuhan dan produksi protease ialah pada pH 9.0 dan suhu 45 °C. Sel mulai memasuki fase stasioner pada jam ke-12 dan aktivitas enzim maksimum dicapai sekitar akhir fase stasioner, yaitu sekitar jam ke-24 sampai 27.

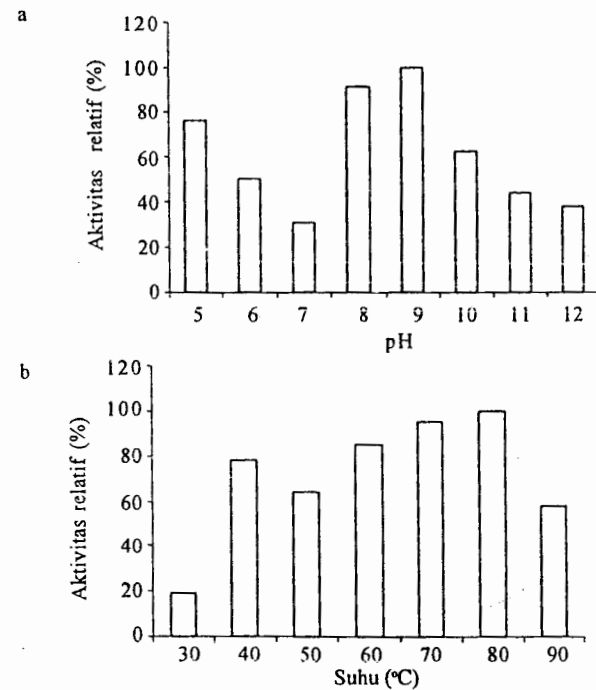
Selain pH dan suhu, produksi enzim juga dipengaruhi oleh jenis substrat. Dari beberapa jenis substrat yang diujikan dalam fermentasi labu kock diketahui bahwa produksi maksimal protease dicapai dengan substrat glukosa dan pati dibandingkan dengan kaldu nutrien. Glukosa atau pati dapat



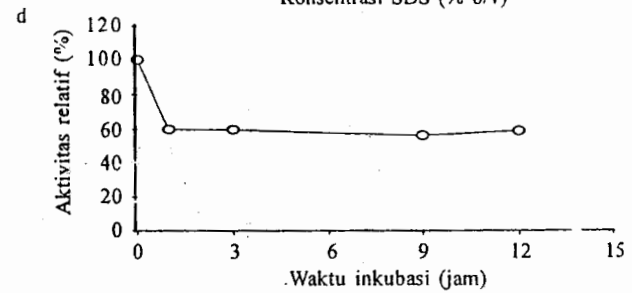
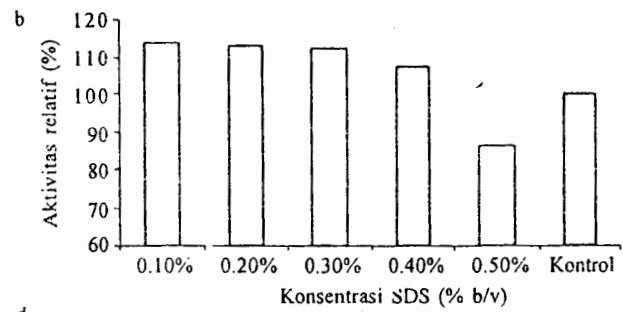
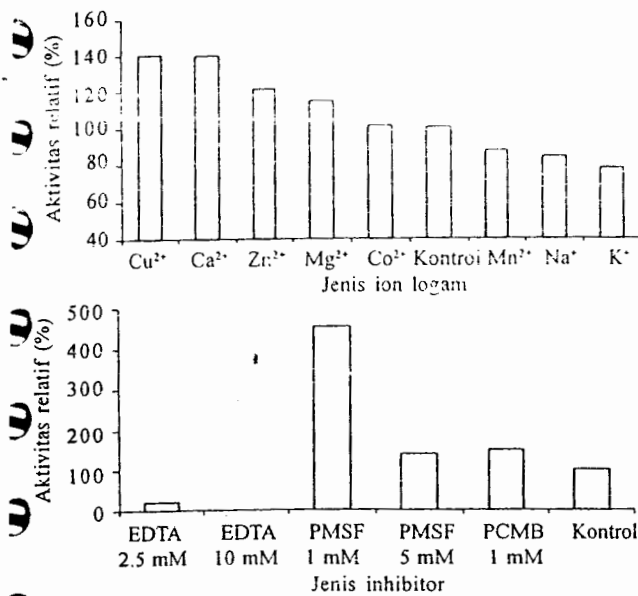
Gambar 5. Profil kurva pertumbuhan sel, aktivitas protease dan kandungan protein dari *B. thermoglucosidasius* AF-01 dalam fermentor (750 ml media) dengan kondisi fermentasi pada suhu 45 °C, pH 9.0, agitasi 150 rpm, aerasi 1 vvm, waktu fermentasi 30 jam.

Tabel 2. Hasil fraksinasi dengan amonium sulfat

Jenis contoh	Volume (ml)	Aktivitas (U/ml)	Total aktivitas (U)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Perolehan (%)
Enzim kasar	500	33.04	16519.05	14.49	7245.80	2.28	
Ultrafiltrasi	200	49.44	9887.90	15.90	3180.87	3.11	39.85
Fraksi 20%S	2	39.10	78.20	53.81	107.61	0.73	0.47
Fraksi 50%S	1.5	69.06	103.53	75.26	112.88	1.21	0.62
Fraksi 70%S	2	81.31	162.62	58.00	116.00	1.40	0.98
Fraksi 80%S	1.5	30.45	45.67	51.48	77.22	0.59	0.27



Gambar 6. pH (a) dan suhu optimum (b) aktivitas protease *Bacillus* sp. isolat AF-01.



Gambar 7. Pengaruh ion logam (a), SDS dengan berbagai konsentrasi (b), inhibitor protease (c) terhadap aktivitas protease *B. thermoglucosidasius* AF-01. Uji stabilitas enzim pada kondisi optimal (pH 9.0) diinkubasi pada suhu 80 °C selama 12 jam (d).

digunakan sebagai substrat alternatif untuk media pertumbuhan sel dan produksi protease AF-01. Media tersebut memberikan hasil yang jauh lebih baik dibandingkan dengan media kaldu nutrisi saja. Sumber karbon di dalam media kaldu nutrisi tidak mencukupi untuk mendukung pertumbuhan sel sehingga produksi protease pun jauh lebih rendah.

Sementara itu, pada kultur fermentasi menggunakan fermentor dengan kondisi pH dan suhu terjaga (pH 9.0, 45 °C) diperoleh produksi maksimal protease dengan substrat glukosa jauh lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan media substrat pati (Gambar 5). Pada kondisi tersebut diduga konsentrasi glukosa sangat berpengaruh terhadap proses produksi enzim. Glukosa diketahui memberikan efek represi katabolit pada kebanyakan bakteri, khamir, dan kapang (Crueger & Crueger 1984). Untuk optimasi proses dalam industri, konsentrasi glukosa dalam media sangat diperhatikan. Perbedaan konsentrasi substrat (glukosa) walaupun kecil akan sangat mempengaruhi tingkat produktivitas yang diharapkan. kadar glukosa sebesar 1% (b/v) dilaporkan merupakan konsentrasi sumber karbon terbaik untuk produksi protease *Bacillus* sp. (Fujiwara *et al.* 1993).

Cairan fermentasi bebas sel yang mengandung protease dapat dipisahkan dengan ultrafiltrasi tangensial pada suhu dingin (4 °C) untuk meningkatkan konsentrasi enzim dan menghilangkan sebagian senyawa lain (molekul kecil) yang terkandung dalam media atau produk metabolit lainnya. Pada proses purifikasi parsial dengan amonium sulfat sebagian besar protease AF-01 terendapkan pada konsentrasi 50% dan 70% saturasi. Indikasi yang diberikan ialah nilai aktifitas spesifik yang relatif lebih tinggi. Namun, hasil akhir yang diperoleh (*recovery yield*) sangat rendah, masing-masing sebesar 0.62% dan 0.98%. Masalah ini kemungkinan terjadi karena proses pengendapan yang kurang sempurna seperti waktu pengendapan yang tidak terlalu lama (hanya 1-2 jam) dan kualitas amonium sulfat yang digunakan (kualitas teknis).

Suhu dan pH optimum aktivitas protease AF-01 ialah 80 °C dan pH 9.0. Nilai aktivitas protease yang bervariasi dengan adanya perubahan pH disebabkan pengaruh perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Suhu dan pH optimum aktivitas protease termostabil dari *Bacillus* yang pernah diteliti antara lain 60 °C dan pH 11 pada *Bacillus* sp. NG312 (Jasvir *et al.* 1999), 60-70 °C dan pH 10 pada *Bacillus* sp. (Gupta *et al.* 1999), 80 °C dengan penambahan ion Ca²⁺ pH 8-10 pada *Bacillus* sp. PS719 (Towatana *et al.* 1999), dan 70 °C dan pH 10.0 dari galur mutan M-3-20 berasal dari *Bacillus* sp. No 58 (Fuad 2002). Malikhah (1995) mempelajari protease *B. pumilus* Y3 asal limbah cair tahu yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 50 °C dan pH 7.5.

Beberapa ion logam memberikan pengaruh positif terhadap aktivitas protease AF-01, sedangkan beberapa logam lainnya memberikan pengaruh negatif. Hal ini menunjukkan bahwa enzim tersebut berinteraksi dengan ion logam tertentu (Cu²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, dan Mg²⁺) sebagai kofaktor untuk meningkatkan aktivitasnya. Ion logam tersebut merupakan contoh kation yang dapat mengaktifkan enzim golongan metaloenzim. Selain itu kehadiran EDTA ternyata juga mampu menekan dan menghilangkan aktivitas protease AF-01. Sebaliknya, senyawa inhibitor lain seperti PMSF dan PMCB, masing-masing merupakan inhibitor protease-serina dan protease-sisteina, tidak menekan aktivitas enzim. Dengan demikian diduga protease AF-01 tergolong ke dalam kelompok metaloprotease.

Pengaruh penambahan SDS terhadap aktivitas enzim baru terlihat pada konsentrasi sebesar 0.5% (b/v). Sementara sampai dengan konsentrasi 0.4% SDS, aktivitas enzim sama sekali tidak terhambat. Kemampuan detergen dalam melarutkan protein sering dikaitkan dengan nilai *the critical micelle concentration* (CMC). Nilai CMC untuk SDS ialah 7-10 mM (0.23% b/v) (Bollag & Edelstein 1991). Protease *Bacillus* sp. NG312 dilaporkan stabil terhadap berbagai jenis detergen, salah satunya SDS dengan konsentrasi 1 g/l (0.1% b/v) dan aktivitasnya bertahan 80% (Jasvir *et al.* 1999).

Tabel 3. Stabilitas terhadap panas dari aktivitas proteolitik beberapa jenis protease

Jenis dan sumber protease	Suhu dan pH uji (+ senyawa penstabil)	Waktu paruh (menit)	Sumber acuan
Protease-serin alkali HS <i>Bacillus</i> sp. GX6638	50 °C, pH 10.5 (+ EDTA)	200	Durham <i>et al.</i> (1987)
	60 °C, pH 9.4 (+ EDTA)	25	
	60 °C, pH 10.5 (+ Ca ²⁺)	2	
Subtilisin Carlsberg (tipe III) (Sigma Chemical Co.) <i>B. subtilis</i>	50 °C, pH 10.5 (+ EDTA)	3.4	Durham <i>et al.</i> (1987)
	60 °C, pH 9.4 (+ EDTA)	2.5	
	60 °C, pH 10.5 (+ Ca ²⁺)	0.5	
Protease alkali <i>B. stearothermophilus</i> F1	90 °C, pH 9.0	15	Rahman <i>et al.</i> (1994)
Protease alkali <i>B. stearothermophilus</i> AP4	80 °C, pH 9.0	30	Dhandapani & Vijayaragavan (1994)
Protease alkali <i>B. brevis</i>	60 °C, pH 10.5	6 jam	Banerjee <i>et al.</i> (1999)
	50 °C, pH 10.5	60 jam	
	60 °C, pH 10.5 (+ CaCl ₂ , + Glisina)	120 jam	
	80 °C, pH 9.0	> 12 jam	
Protease-metal alkali <i>B. thermoglucosidasius</i> AF-01	80 °C, pH 9.0	> 12 jam	Penelitian ini

Enzim adalah protein yang mudah terdenaturasi oleh panas. Oleh karena itu uji stabilitas enzim terhadap panas sangat penting. Pada kondisi optimum (80 °C dan pH 9.0) protease AF-01 dapat mempertahankan kestabilan aktivitasnya sebesar 60% selama 12 jam. Ini berarti waktu paruh aktivitasnya lebih dari 12 jam pada kondisi tersebut. Kestabilan enzim terhadap suhu dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti struktur tiga dimensi, komposisi asam amino, jembatan disulfida, dan senyawa penstabil lain seperti ion logam (Daniel 1996). Sebagai acuan waktu paruh protease AF-01 bisa dibandingkan dengan beberapa jenis protease alkali yang pernah dilaporkan sebelumnya (Tabel 3).

Pada penelitian ini belum dilakukan uji stabilitas enzim menggunakan senyawa penstabil atau ion logam seperti Ca²⁺ atau Mg²⁺ yang umumnya turut menjaga kestabilan enzim terhadap panas. Meskipun demikian, dari informasi yang diperoleh mengenai beberapa karakter fisiko-kimia enzim tersebut, ada harapan besar bahwa protease AF-01 ini dapat diaplikasikan pada beberapa industri yang memerlukan spesifikasi khusus seperti industri detergen. Enzim yang dapat digunakan sebagai aditif pada produk detergen haruslah enzim yang memiliki aktivitas tinggi pada rentang pH basa (> pH 8.0), tidak terlalu terpengaruh oleh adanya senyawa detergen ataupun ion-ion logam yang umumnya banyak dijumpai dalam detergen dan dapat bekerja pada rentang suhu yang relatif luas (dingin atau panas). Protease AF-01 menunjukkan beberapa karakteristik tersebut, seperti relatif stabil pada suhu tinggi (80 °C) dan dapat bekerja efektif pada rentang suhu yang luas (40-90 °C), efektif bekerja pada rentang pH alkalin (pH 8.0-10.0), relatif stabil pada konsentrasi SDS sampai dengan 0.5% (b/v) dan menunjukkan aktivitas relatif yang cukup baik (>80%) dengan adanya berbagai senyawa ion yang telah diuji. Meskipun demikian masih ada sedikit kendala pada enzim ini untuk dapat diaplikasikan, seperti aktivitas yang relatif rendah (20% dari aktivitas maksimum) pada suhu rendah (30 °C). Meskipun demikian, melalui kombinasi dengan enzim protease lainnya, diharapkan enzim ini dapat dimanfaatkan pada industri detergen atau industri lain yang memerlukan sifat yang unik dari enzim tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Banerjee UC, Sani RK, Azmi W, Soni R. 1999. Thermostable alkaline proteases from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem* 35:213-219.
- Biolog. 1993. *Biolog Microstation™ System*. California: Biolog Inc.
- Bollag DM, Edelman SJ. 1991. *Protein Methods*. Geneva: J Wiley.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Crueger W, Crueger A. 1984. *Biotechnology: A Text book of Industrial Microbiology*. Madison: Science Tech.
- Daniel RM. 1996. The upper limits of enzyme thermal stability. *Enzyme Microbial Tech* 19:74-79.
- Dhandapani R, Vijayaragavan R. 1994. Production of a thermophilic, extracellular alkaline proteases by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *World J Microbiol Biotechnol* 10:33-35.
- Durham DR, Stewart DB, Stelweg EJ. 1987. Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain GX 6638. *J Bacteriol* 169:2762-2768.
- Fuad AM. 2002. Protease alkali ekstrasellular dari isolat *Bacillus* sp. No.58: Perbaikan galur untuk peningkatan produksi protease melalui mutagenesis. *Abstrak Seminar Bioteknologi dan Kongres III Konsorsium Bioteknologi Indonesia*. Bandung, 10-11 Okt 2002. P12, hlm 94.
- Fujiwara N, Matsui A, Imanaka T. 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. *J Biotechnol* 30:245-256.
- Gupta R, Gupta K, Saxena RK, Khan S. 1999. Bleach-stable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett* 1:135-138.
- Hok JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jasvir S, Navdeep G, Gina D, Debendra KS. 1999. Studies on alkaline protease produced by *Bacillus* sp. NG312. *Appl Biochem Biotechnol* 76:57-63.
- Malikhah I. 1995. Karakterisasi protease *Bacillus pumilus* Y3 yang diisolasi dari limbah cair tahu [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rahman RNZA *et al.* 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl Microbiol Biotechnol* 40:822-827.
- Rao MB, Tangsale AM, Ghasge MS, Deshapande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microb Mol Biol Rev* 62:597-635.
- Stanbury PF, Whitaker A. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford: Pergamon Pr.
- Towatana NH, Painupong A, Suintanaler P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. *J Biosci Bioeng* 87:581-587.