



**PEMURNIAN, KARAKTERISASI, DAN ANALISIS
MOLEKULER PROTEASE
Lacticaseibacillus paracasei IN17 ASAL INASUA**

SAKINA MAYA MAULAWI



**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Pemurnian, Karakterisasi, dan Analisis Molekuler Protease *Lacticaseibacillus paracasei* IN17 Asal Inasua” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2025

Sakina Maya Maulawi
G3501241038

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RINGKASAN

SAKINA MAYA MAULAWI. Pemurnian, Karakterisasi, dan Analisis Molekuler Protease *Lacticaseibacillus paracasei* IN17 Asal Inasua. Dibimbing oleh NISA RACHMANIA MUBARIK dan LAKSMI AMBARSARI.

Protease merupakan enzim pengurai protein yang dapat dihasilkan oleh berbagai organisme, termasuk bakteri proteolitik seperti *Acinetobacter*, *Bacillus*, dan *Lactobacillus*. Bakteri ini berperan penting dalam industri karena dapat dikulturkan dan direkayasa secara genetik. Inasua ialah makanan fermentasi ikan khas Maluku, diketahui mengandung bakteri asam laktat (BAL). Salah satu isolat asal inasua, yaitu *Lacticaseibacillus paracasei* IN17 diketahui dapat memproduksi protease ekstraseluler dan telah melalui tahap awal pemurnian menggunakan amonium sulfat 20 %. Tahapan lanjutan seperti dialisis untuk meningkatkan kemurnian dan aktivitasnya serta analisis terhadap protease intraseluler diperlukan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk memurnikan, karakterisasi, dan menganalisis secara molekuler gen penyandi protease dari *L. paracasei* IN17 asal inasua.

Produksi protease dilakukan dalam media selektif dengan inkubasi statis. Enzim diekstraksi dari fraksi ekstraseluler dan intraseluler, fraksi terpilih kemudian dimurnikan melalui pengendapan amonium sulfat 20 % dan dialisis. Karakterisasi enzim meliputi penentuan pH dan suhu optimum, pengaruh ion logam, parameter kinetik, serta analisis berat molekul dan aktivitas enzim menggunakan *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan zimogram. Analisis molekuler dilakukan melalui amplifikasi gen penyandi protease *prtP* serta memprediksi struktur tiga dimensi dari protease PrtP.

L. paracasei IN17 dapat menghasilkan enzim protease secara ekstraseluler maupun intraseluler. Fraksi intraseluler IN17 menunjukkan aktivitas spesifik sebesar 0,023 U/mg, nilai yang relatif rendah dibanding ekstraseluler. Aktivitas spesifik protease ekstraseluler setelah pemurnian meningkat dari 0,079 U/mg menjadi 0,182 U/mg, dengan perolehan enzim mencapai 18,87 %. Hasil ini menunjukkan peningkatan kemurnian yang efektif, sesuai strategi optimal dalam pemurnian enzim. Aktivitas protease tertinggi diperoleh pada pH 6 untuk ekstraseluler dan pH 7 untuk intraseluler, dengan suhu optimum masing-masing pada 37 °C. Ion logam seperti Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+} mampu meningkatkan aktivitas enzim, sementara EDTA tidak secara signifikan menurunkan aktivitas, sehingga protease ini belum dapat digolongkan sebagai metaloprotease. Aktivitas protease ekstraseluler meningkat seiring dengan volume fermentasi, sedangkan enzim intraseluler memiliki keunggulan stabilitas dan konsentrasi karena tidak terencerkan oleh media.

Parameter kinetik menunjukkan bahwa nilai konstanta Michaelis (K_m) protease intraseluler 1,48 kali lebih besar dibandingkan protease ekstraseluler, yang menunjukkan afinitas substrat yang lebih rendah. Sebaliknya, nilai kecepatan maksimum (V_{maks}) enzim ekstraseluler 2,85 kali lebih tinggi daripada enzim intraseluler, mengindikasikan kemampuan katalitik yang lebih tinggi. Nilai K_m yang lebih kecil dan V_{maks} yang lebih besar pada fraksi ekstraseluler menunjukkan bahwa enzim tersebut lebih efisien dalam mengikat substrat walaupun pada kondisi konsentrasi substrat yang lebih rendah. Hasil SDS-PAGE menunjukkan beberapa

pita protein, dan pada fraksi intraseluler terdeteksi pita dominan berukuran ~26 kDa yang teridentifikasi sebagai protease aktif melalui uji zimogram. Pita ~26 kDa ini identik dengan ukuran protease dari bakteri lain yang memiliki aktivitas proteolitik intraseluler. Sementara pada ekstraseluler, meskipun muncul beberapa pita protein, tidak terbentuk zona tidak berwarna pada gel zimogram, kemungkinan akibat rendahnya konsentrasi protein.

Gen penyandi protease *prtP* berhasil diamplifikasi dengan ampikon berukuran ~5800 pb, yang memberikan bukti molekuler bahwa *L. paracasei* IN17 memiliki potensi sebagai sumber *cell envelope protease*. Struktur tiga dimensi protease hasil prediksi memperlihatkan bahwa domain katalitik protease ekstraseluler *L. paracasei* IN17 memiliki kesesuaian dengan karakteristik protease kelompok serin protease, termasuk keberadaan triad katalitik khas Ser-His-Asp. Model ini menunjukkan lipatan khas serin protease dan keberadaan domain penyusun seperti pre-pro-domain dan domain pengikat dinding sel (*anchor*). Prediksi ini memberikan gambaran awal mengenai kemungkinan mekanisme kerja protease dan relevansinya terhadap aktivitas enzimatik yang diamati secara eksperimental.

Penemuan ini juga memperluas informasi bahwa strain dari sumber non-susu seperti inasua juga dapat mengandung gen yang sama dengan galur dari produk fermentasi susu. Temuan ini mengindikasikan bahwa protease dari *L. paracasei* IN17 memiliki potensi bioteknologi yang tinggi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai enzim industri, khususnya dalam aplikasi fermentasi pangan maupun pemrosesan protein.

Kata kunci: dialisis, intraseluler, *prtP*, SDS-PAGE, zimogram



SUMMARY

SAKINA MAYA MAULAWI. Purification, Characterization, and Molecular Analysis of Protease from *Lacticaseibacillus paracasei* IN17 Isolated from Inasua. Supervised by NISA RACHMANIA MUBARIK and LAKSMI AMBARSARI.

Proteases are protein-degrading enzymes that can be produced by various organisms, including proteolytic bacteria such as *Acinetobacter*, *Bacillus*, and *Lactobacillus*. These bacteria play an important role in industry because they can be cultured and genetically engineered. Inasua, a traditional fermented fish product from Maluku, is known to contain lactic acid bacteria (LAB). One isolate from inasua, *Lacticaseibacillus paracasei* IN17, has been found to produce extracellular protease and has undergone preliminary purification using 20 % ammonium sulfate. Further steps, such as dialysis to increase purity and activity, as well as analysis of intracellular protease, are necessary. Therefore, this study was conducted to purify, characterize, and analyze the protease-encoding gene from *L. paracasei* IN17 isolated from inasua.

Protease production was carried out in selective media under static incubation. Enzymes were extracted from both extracellular and intracellular fractions, and the selected fractions were then purified through 20 % ammonium sulfate precipitation and dialysis. Enzyme characterization included determination of optimal pH and temperature, the effect of metal ions, kinetic parameters, and analysis of molecular weight and enzymatic activity using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and zymogram. Molecular analysis was conducted through amplification of the protease-encoding gene *prtP* and prediction of the three-dimensional structure of PrtP protease.

L. paracasei IN17 was capable of producing protease both extracellularly and intracellularly. The intracellular fraction showed a specific activity of 0,023 U/mg, a relatively low value compared to the extracellular fraction. The specific activity of the extracellular protease increased from 0,079 U/mg to 0,182 U/mg after purification, with an enzyme yield of 18,87 %. These results indicate an effective increase in purity, in line with optimal enzyme purification strategies. The highest protease activity was observed at pH 6 for the extracellular fraction and pH 7 for the intracellular fraction, with optimal temperature at 37 °C for both. Metal ions such as Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} enhanced enzyme activity, while EDTA did not significantly reduce activity, suggesting that this protease cannot yet be classified as a metalloprotease. The extracellular protease activity increased with fermentation volume, while the intracellular enzyme had advantages in stability and concentration since it was not diluted by the medium.

Kinetic parameters showed that the Michaelis constant (K_m) value of the intracellular protease was 1,48 times higher than that of the extracellular protease, indicating lower substrate affinity. Conversely, the maximum velocity (V_{max}) of the extracellular enzyme was 2,85 times higher than that of the intracellular enzyme, suggesting higher catalytic capability. The lower K_m and higher V_{max} values of the extracellular fraction indicate that the enzyme is more efficient in substrate binding even at lower substrate concentrations. SDS-PAGE results revealed several protein bands, and a dominant ~26 kDa band was detected in the intracellular fraction, identified as an active protease by zymogram analysis. This ~26 kDa band is consistent with the size of intracellular proteases from other bacteria. In the extracellular fraction, although several protein bands were present, no clear zone was formed in the zymogram gel, possibly due to the low protein concentration.

The *prtP* protease gene was successfully amplified, producing an amplicon of approximately 5800 bp, providing molecular evidence that *L. paracasei* IN17 has the potential as a source of cell envelope protease. The predicted three-dimensional structure of the protease showed that the catalytic domain of the extracellular protease from *L. paracasei* IN17 aligns with the characteristics of serine proteases, including the presence of the catalytic triad Ser-His-Asp. The model displayed the typical fold of serine proteases and contained structural domains such as the pre-pro-domain and a cell wall anchor domain. This prediction provides an initial insight into the possible mechanism of action of the protease and its relevance to the enzymatic activity observed experimentally.

These findings also expand current knowledge by showing that strains from non-dairy sources such as inasua can contain genes similar to those found in dairy-fermented product strains. This suggests that the protease from *L. paracasei* IN17 has significant biotechnological potential for further development as an industrial enzyme, particularly for applications in food fermentation and protein processing.

Keywords: dialysis, intracellular, *prtP*, SDS-PAGE, zimogram.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2025
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.



**PEMURNIAN, KARAKTERISASI, DAN ANALISIS
MOLEKULER PROTEASE
Lacticaseibacillus paracasei IN17 ASAL INASUA**

SAKINA MAYA MAULAWI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Mikrobiologi

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Tim Penguji pada Ujian Tesis:
Dr. Popi Asri Kurniatin S.Si., Apt., M.Si.



IPB University
— Bogor Indonesia —

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University

Judul Tesis : Pemurnian, Karakterisasi, dan Analisis Molekuler Enzim
Protease *Lacticaseibacillus paracasei* IN17 Asal Inasua
Nama : Sakina Maya Maulawi
NIM : G3501241038

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M. Si.

Pembimbing 2:

Prof. Dr. Dra. Laksmi Ambarsari, M.S.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Prof. Dr. Anja Meryandini, M.S.

NIP 196203271987032001

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam:

Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si.

NIP 197807232007011001

Tanggal Ujian: 1 Agustus 2025

Tanggal Lulus:



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak Oktober 2024 sampai Mei 2025 ini ialah prospeksi mikrob, dengan judul “Pemurnian, Karakterisasi, dan Analisis Molekuler Protease *Lacticaseibacillus paracasei* IN17 Asal Inasua”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam penelitian ini, khususnya:

1. Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si. dan Prof. Dr. Dra. Laksmi Ambarsari, M.S. selaku dosen pembimbing yang telah memberi saran, arahan, serta motivasi selama penelitian dan penyusunan karya ilmiah.
2. Pembimbing akademik, moderator seminar, dan penguji luar komisi pembimbing.
3. IPB yang telah menyediakan beasiswa *fast-track* SINERGI 2023 sehingga penulis mendapatkan banyak wawasan baru selama menjalani program sarjana dan magister.
4. Heni Rismiyati dan Aldian Permana, S.Si. selaku staf Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, IPB yang membantu saat penelitian.
5. Eko Darwiyanto, S.T., M.T. Nurul Aini, S.Pd. Mahdi Shiddieqy Setatama, Salma Ainun Savitri, Rifqi Hosea Anshory, serta seluruh keluarga atas dukungan, doa, dan kasih sayang yang diberikan.
6. Orhinta Mutiara Jati, Risya Ayudya Fadillah, Miryam Madeleine Therese, Julita Catri Adila, dan Fio Febrian sebagai teman sinergi 2023 yang tiada henti memberikan bantuan, diskusi, dan semangat dalam menyelesaikan penelitian.
7. Teman-teman di laboratorium mikrobiologi dan mikrobiologi angkatan 2023 dan 2024 atas diskusi, bantuan, dan kebersamaan saat penelitian.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2025

Sakina Maya Maulawi

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	1
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Protease	3
2.2 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	4
2.3 Inasua	5
2.4 Pemurnian Enzim	6
2.5 Gen Penyandi Protease di Bakteri Asam Laktat	7
III METODE	10
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.2 Alur Penelitian	10
3.3 Alat dan Bahan	10
3.4 Produksi Protease dari <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> IN17	11
3.5 Pemekatan Protease dengan Amonium Sulfat	11
3.6 Pemurnian Protease dengan Dialisis	11
3.7 Pengujian Aktivitas Protease	12
3.8 Pengukuran Kadar Protein Protease	12
3.9 Penentuan Aktivitas Optimum Protease	12
3.10 Penentuan Nilai Km dan Vmaks Protease	13
3.11 Penentuan Berat Molekul Protease dengan SDS-PAGE dan Zimogram	13
3.12 Analisis Molekuler Gen Penyandi Protease	14
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Konfirmasi Isolat <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> IN17	15
4.2 Pemurnian Protease <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> IN17	15
4.3 Karakter Aktivitas Optimum Protease	16
4.4 Pengaruh Kation Logam dan Senyawa Inhibitor	17
4.5 Nilai Km dan Vmaks Protease	17
4.6 Berat Molekul Protein dengan SDS-PAGE	19
4.7 Deteksi Gen Penyandi Protease dan Prediksi Struktur 3D	20
4.8 Pembahasan	24
V SIMPULAN DAN SARAN	29
5.1 Simpulan	29
5.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	37
RIWAYAT HIDUP	53



DAFTAR TABEL

1	Komposisi gel pemisah dan gel penahan untuk SDS-PAGE dan zimogram (modifikasi Laemmli 1970)	13
2	Hasil tahapan pemurnian protease IN17	15
3	Perbandingan protease IN17 dengan protease bakteri lainnya	19

DAFTAR GAMBAR

1	Representasi skematik PrtP dari <i>Lactobacillus paracasei</i> (model menurut Siezen 1999)	8
2	Alur penelitian	10
3	Karakter morfologi <i>Lactobacillus paracasei</i> IN17	15
4	Aktivitas protease <i>L. paracasei</i> IN17 pada berbagai pH. Garis vertikal (bar) menunjukkan standar deviasi	16
5	Aktivitas protease <i>L. paracasei</i> IN17 pada berbagai suhu. Garis vertikal (bar) menunjukkan standar galat	16
6	Aktivitas protease <i>L. paracasei</i> IN17 hasil dialisis pada berbagai kation logam dan inhibitor. Garis vertikal (bar) menunjukkan standar deviasi	17
7	Aktivitas protease <i>L. paracasei</i> IN17 intraseluler pada berbagai kation logam dan inhibitor. Garis vertikal (bar) menunjukkan standar deviasi	17
8	Kurva Lineweaver-Burk enzim protease <i>L. paracasei</i> IN17 hasil dialisis ekstraseluler	18
9	Kurva Lineweaver-Burk enzim protease <i>L. paracasei</i> IN17 intraseluler <i>crude</i>	18
10	Hasil pembacaan gel SDS-PAGE	19
11	Hasil pembacaan gel zimogram	20
12	Visualisasi amplikon gen <i>prtP</i> (~5800 pb)	20
13	Fragmen hasil <i>sequencing</i> gen <i>prtP</i> yang terbaca dari <i>primer</i> 1553F (posisi 39-1039 pb) dan 7353R (posisi 4422-5761 pb) terhadap sekuen referensi M83946.1	21
14	Struktur 3D PrtP IN17 diprediksi menggunakan SWISS-MODEL berdasarkan sekuen NCBI M83946.1	21
15	Superimposisi struktur antara model PrtP dari SWISS-MODEL (merah) dan struktur dari Christensen <i>et al.</i> (2023) (biru)	22
16	Struktur tiga dimensi protease PrtP terdiri dari domain prepro (kuning), domain katalitik (jingga), domain PA (magenta), dan motif LPXTG (hijau), dan residu situs katalitik (merah) (A), serta tampilan perbesaran pada situs katalitik PrtP (B)	22
17	Superimposisi struktur domain PP (kuning) pada model PrtP dengan prediksi struktur dari fragmen 1553F hasil <i>sequencing</i> (hijau)	23
18	Superimposisi struktur PrtP dengan prediksi struktur dari fragmen 7353R hasil <i>sequencing</i> (merah)	23
19	Superimposisi struktur domain katalitik (PR domain) dari model PrtP (jingga) dengan struktur serin protease dari <i>Bacillus alcalophilus</i> (hijau, PDB ID: 1AH2)	24

DAFTAR LAMPIRAN

1	Prosedur pembuatan media dan reagen yang digunakan saat penelitian	38
2	Konsentrasi amonium sulfat setiap saturasi	40
3	Metode pengujian aktivitas protease (Walter 1984)	41
4	Kurva standar protein <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	42
5	Aktivitas protease hasil pemekatan pada berbagai pH dan suhu	43
6	Aktivitas protease pada berbagai kation logam 2 mM dan 5 mM	44
7	Aktivitas protease pada berbagai konsentrasi Kurva Michaelis-Menten	45
8	Analisis pita SDS-PAGE	48
9	<i>Primer gen prtP</i>	50
10	Nilai konsentrasi DNA genom IN17 dan analisis ukuran ampikon	51
11	Analisis molekuler protease PrtP	52