

KARAKTERISASI PARSIAL EKSTRAK KASAR ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396

Partial Characterization of Crude Protease Extracted from Bacillus amyloliquefaciens NRRL B-14396

Novita W¹⁾., K. Arief ¹⁾, F.C. Nisa¹⁾, dan U. Murdiyatmo²⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

²⁾Pusat Penelitian Pabrik Gula Indonesia

ABSTRACT

This research was aimed to determine the characteristics of crude proteases extracted from Bacillus amyloliquefaciens NRRL B-14396, namely the stability of enzyme during storage at low temperature, the optimum pH and temperature, kinetic constants (V_m and K_m) and some inhibitors and activators that influence the enzyme activity and to evaluate the stability of enzyme during storage at low temperature.

The results showed that the stability of protease extracted from Bacillus amyloliquefaciens NRRL B-14396 decreased with time when stored at 4°C. It was found two classes of protease, i.e. the one with an optimum pH of 7.5, classified as the neutral protease, and that with the optimum pH of 9.0, known as alkaline protease. The activity levels of the neutral and alkaline proteases were 0.475 Unit/ml and 0.410 Unit/ml, respectively. The optimum temperature was 50°C, at which the activity level was of 0.516 Unit/ml. Ca^{2+} ion functions as a stabilizer whereas Zn^{2+} and Fe^{2+} ions as activators. The addition Mg^{2+} ion, SDS, and EDTA inhibited the activity. The respective values of K_m and V_m of the neutral protease were 0.167% and 0.633 Unit/ml, while those values of the alkaline protease were 0.661% and 0.924 Unit/ml.

Key words: *characterization, protease, Bacillus amyloliquefaciens.*

PENDAHULUAN

Menurut pendapat Saraswati (1992) dalam Nuraini (2002), enzim merupakan salah satu produk industri dan mempunyai nilai ekonomis yang cukup tinggi di pasaran dunia saat ini. Produk enzim yang memiliki prospek baik untuk dikembangkan adalah protease, amilase, amiloglukosidase karena dipandang cukup luas penggunaannya dalam berbagai industri terutama industri pangan. Diperkirakan nilai perdagangan enzim di seluruh dunia adalah 1 milyar USD dan 75 % adalah enzim hidrolitik. Protease merupakan satu dari tiga kelompok terbesar dari industri enzim dan diperkirakan sebesar 60% dari perdagangan enzim di seluruh dunia (Rao *et al.*, 1998).

Protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein.

Enzim protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan baik dalam industri pangan maupun non pangan. Di bidang industri pangan penggunaan enzim protease adalah dalam industri keju, bir, roti dan daging, sedangkan di bidang non pangan paling banyak digunakan di industri detergen, farmasi, fotografi, tekstil dan kulit (Suhartono, 1989).

Sumber enzim bisa berasal dari hewan, tanaman dan mikroorganisme, dan untuk keperluan industri biasanya enzim diperoleh dari mikroorganisme. Protease yang dihasilkan dari mikroorganisme mempunyai beberapa keunggulan bila dibanding protease dari sumber lainnya, karena dapat diproduksi dalam jumlah besar, produktivitasnya mudah ditingkatkan, mutu lebih seragam, harga lebih murah, dapat ditumbuhkan dengan cepat, pertumbuhannya mudah diatur,

enzim yang dihasilkan mudah diisolasi. Keunggulan lainnya adalah mikroorganisme dapat hidup dan berkembang biak dalam media limbah pertanian yang relatif lebih murah. Adanya mikroorganisme unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim (Stanbury and Whitaker, 1984).

Enzim subtilisin Novo diproduksi oleh varietas *Bacillus subtilis* yang sekarang dinamakan *Bacillus amyloliquefaciens* menurut Bergey's Manual edisi delapan (1974). Mikroorganisme spesies ini banyak digunakan karena memiliki karakteristik yang baik untuk menghasilkan protease alkali. *Bacillus amyloliquefaciens* dapat memproduksi beberapa jenis enzim lain yang memiliki potensi komersial seperti α -amylase, β -glucanase, hemicellulase dan protease netral (Rose, 1980).

Menurut Suhartono (1989), faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, produk, pH, suhu, kekuatan ion (konstanta dielektrik), jenis pelarut yang terdapat pada lingkungan, senyawa inhibitor dan aktivator. Selain itu juga penentuan berat molekul, titik isoelektrik dan struktur enzim tersebut untuk mengetahui golongan fungsional pada lokasi aktif dan urutan asam amino enzim.

Untuk mengetahui karakter enzim protease dalam menghidrolisis protein menjadi asam aminonya agar mencapai aktivitas maksimumnya, perlu dipelajari lebih dulu kondisi optimum yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim protease, misalnya suhu, pH, aktivator atau inhibitor, penentuan karakter K_m (jumlah konstanta substrat untuk mencapai aktivitas enzim pada setengah kecepatan maksimum) dan V_m (kecepatan aktivitas enzim maksimum), serta stabilitas enzim pada saat penyimpanan. Oleh karena itu, karakterisasi yang dilakukan pada penelitian ini disebut karakterisasi parsial karena tidak semua karakterisasi dilakukan. Karakterisasi tersebut akan dilakukan pada protease yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu oleh Choi dan Kim (2001) yang memproduksi protease serin dengan menggunakan *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-4 namun penelitian tersebut lebih menitikberatkan pada pengaruh NaCl dan kestabilannya terhadap panas, kemudian Son dan Kim (2003) juga melakukan penelitian dengan menggunakan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* S-94 dengan menggunakan inhibitor PMSF sehingga diketahui protease yang dihasilkan termasuk sebagai protease serin. Pada tahun yang sama mereka melakukan penelitian lagi dengan bakteri yang sama dan ternyata bakteri tersebut dapat menghasilkan endopeptidase, inhibitor yang digunakan antara lain: PMSF (inhibitor protease serin), E-64 (inhibitor protease sistein), pepstatin (inhibitor protease aspartat), EDTA (inhibitor protease metal).

Selain itu Chao et, al (2006) juga meneliti karakterisasi oligopeptidase yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A, antara lain: suhu, pH, inhibitor EDTA dan inhibitor 1,10-Phenanthroline, serta ion-ion logam seperti Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} dan Co^{2+} .

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396, yang meliputi pH optimum, suhu optimum, konstanta kinetik (K_m dan V_m) dan pengaruh beberapa aktivator dan inhibitor terhadap aktivitas enzim protease serta stabilitas enzim selama penyimpanan.

BAHAN DAN METODE

Alat

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain : "glassware", bunsen, termometer, mikropipet 5 mL, mikropipet 1 mL, mikropipet 200 μ L, jarum ose, pH-meter (Lutron YK-2001PH), "vortex", kompor listrik (Maspion), spektrofotometer VIS/UV (Unico UV-2100 Spectrophotometer), sentrifuse (Hettich EBA 8), "refrigerator", sentrifuse dingin (Hettich Zentrifugen Mikro 22R), "laminar

air flow”, timbangan digital (Denver Instrument M-310), inkubator (Binder), autoklaf (Hiramaya), “shaker waterbath” (Julabo SW 22).

Bahan

1. Isolat *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B - 14396 yang diperoleh dari Laboratorium PASA II Jatiroto.
2. Medium pertumbuhan yang digunakan adalah medium sintetik yang terdiri atas: agar, nutrient agar, pepton, glukosa, ekstrak yeast, NaCl, susu skim.
3. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah bahan kimia jenis pro analisis, antara lain: tirosin, kasein, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaOH, HCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, etanol 95%, asam pospat 85%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, “Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid” (EDTA), “Sodium Dodecyl Sulphate” (SDS), “Tri chloro acetic acid” (TCA), “Bovine Serum Albumin” (BSA), “Coomassie Brilliant Blue” G250.

Produksi dan isolasi enzim protease

Ekstrak kasar enzim protease di produksi dengan menfermentasi media cair sintetik dengan komposisi sebagai berikut: 0,2 gram yeast ekstrak; 0,2 gram pepton; 1,0 gram skim milk; glukosa 0,2 gram dan NaCl 0,4 gram (menurut Son *and* Kim, 2002 yang telah dimodifikasi). Fermentasi dilakukan di dalam “shaker waterbath” pada suhu 37°C, 150 rpm. Isolasi ekstrak kasar enzim protease dilakukan pada waktu inkubasi optimum yang ditetapkan dengan kurva pertumbuhan yaitu 22 jam. Selanjutnya media pertumbuhan disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi yang diperoleh berupa endapan putih dan supernatan berwarna coklat. Supernatan merupakan ekstrak kasar enzim protease yang kemudian dipisahkan dari endapan.

Uji aktivitas enzim protease

Ekstrak kasar enzim protease tersebut dianalisa secara kuantitatif untuk

mengetahui nilai aktivitas enzim dengan menggunakan metode Leewit *and* Pornsukawang (1988). Asam amino sebagai hasil hidrolisis protein yang digunakan dalam analisa ini adalah tirosin. Ke dalam 5 tabung reaksi dituangkan masing-masing 1; 3; 5; 7; 9 ml larutan tirosin 100 mg/liter dan diencerkan sampai 10 ml, sehingga menghasilkan konsentrasi berturut-turut 10; 30; 50; 70; 90 mg/Liter. Salah satu konsentrasi diukur serapannya, menggunakan spektrofotometer UV pada berbagai panjang gelombang sehingga didapat panjang gelombang maksimum, kemudian semua tirosin dengan berbagai konsentrasi diukur absorbansinya. Kurva standar tirosin dibuat dengan menggunakan persamaan linear.

Ke dalam tabung reaksi dituangkan 2 ml larutan kasein 0,5 % dengan 0,5 ml larutan buffer pH 7,0 dan 1 ml protease lalu didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2,5 mL TCA 5 % lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan disentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit. Diambil 1 ml filtrat dan diencerkan sampai 5 ml. Hasil pengenceran diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh yaitu 590 nm. Hasil absorbansinya dikonversikan menjadi konsentrasi tirosin.

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi pelepasan 1 μmol tirosin per menit. Perhitungan aktivitas enzim adalah sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = [\text{tirosin}] \times \frac{V}{p \times q} \times fp$$

- V : volume total sampel percobaan tiap tabung reaksi (ml)
 p : jumlah enzim (ml)
 q : waktu inkubasi (menit)
 fp : faktor pengenceran

Stabilitas selama penyimpanan

Penentuan stabilitas enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim protease setiap enam hari sekali dengan variasi waktu penyimpanan: 0; 6; 12; 18; 24; 30; 36 hari pada stok enzim protease yang disimpan pada suhu 4°C. Prosedur uji aktivitas yang digunakan adalah metode Leewit *and* Pornsukawang (1988), dengan kondisi inkubasi pada suhu 40°C, selama 10 menit dan pH 7,0. Setelah diketahui aktivitas enzim kemudian dapat dihitung aktivitas relatif enzim yaitu persentase perbandingan nilai aktivitas enzim pada hari tertentu dengan nilai aktivitas enzim pada hari ke nol. Oleh karena itu tidak digunakan pH dan suhu optimum karena setelah enzim kasar diperoleh, pada saat itu juga langsung diuji aktivitasnya.

Karakterisasi enzim protease

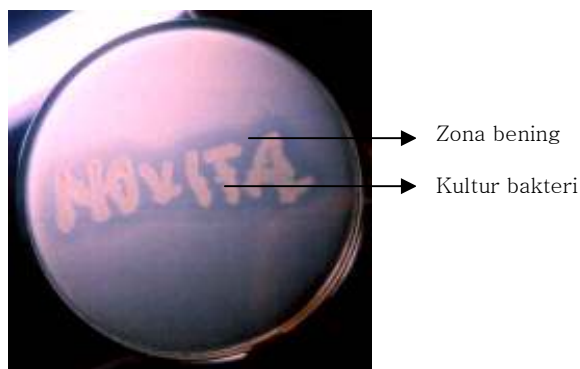
Kondisi optimum yang ditentukan meliputi pH, temperatur serta pengaruh penambahan aktivator dan inhibitor. pH optimum ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada variasi pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 dari buffer fosfat 0,2 M dan buffer karbonat 0,2 M pada temperatur 40°C dengan lama inkubasi 10 menit. Selanjutnya ditentukan temperatur optimum pada pH optimum yang diperoleh dari pengukuran di atas, dengan cara mengukur aktivitas enzim pada variasi suhu inkubasi 40, 45, 50, 55 dan 60 °C.

Pada pH dan suhu optimum, yang telah diketahui kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim dengan menambahkan aktivator dan inhibitor pada substrat, antara lain: ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , EDTA, SDS dengan variasi konsentrasi 10, 100, 1000 ppm. Pada pengujian ini didapatkan aktivitas relatif yaitu persentase perbandingan aktivitas enzim dengan perlakuan penambahan aktivator atau inhibitor dengan aktivitas enzim tanpa adanya perlakuan. Tetapan Michaelis-Menten (K_m) dan laju reaksi maksimum (V_m) ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat kasein yaitu: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0% (b/v) pada kondisi optimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim Protease

Setelah diperoleh ekstrak enzim protease kasar, untuk membuktikan adanya aktivitas enzim protease dilakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif pengujian dilakukan dengan metode Adinarayana *et al.* (2003) yang menggunakan susu skim sebagai substrat. Kultur bakteri digoreskan pada media agar yang mengandung susu skim jika menghasilkan enzim protease akan menghidrolisa susu skim menjadi peptida yang lebih sederhana yang ditunjukkan dengan zona bening disekitar goresan kultur bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396. Bakteri ini ternyata mampu menghasilkan enzim protease, seperti ditunjukkan dengan Gambar 1.



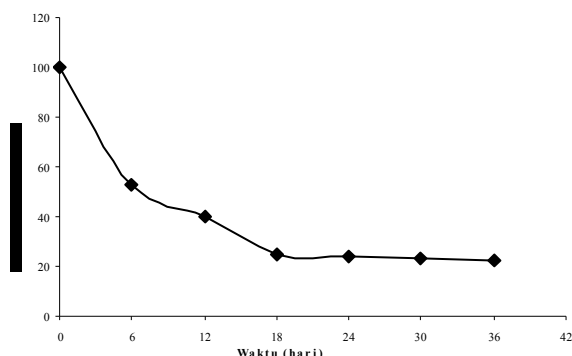
Gambar 1. Aktivitas Enzim Protease pada Susu Skim Agar

Aktivitas enzim protease juga diukur secara kuantitatif dengan menggunakan metode Leewit *and* Pornsukawang (1988). Protease yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 memiliki nilai rerata aktivitas sebesar 0,431 Unit/ml yang berarti setiap 1 ml enzim protease mampu memecah kasein sehingga menghasilkan 0,431 μmol tirosin per menit. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan pada suhu 40°C dan pH 7,0.

Stabilitas Enzim Selama Penyimpanan

Penentuan stabilitas enzim ini dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim protease yang disimpan pada suhu

4°C setiap 6 hari sekali. Pengukuran aktivitas dilakukan pada pH 7,0 dan suhu 40°C. Tujuan pengujian stabilitas enzim dilakukan untuk mengetahui daya tahan enzim selama penyimpanan setelah proses produksi enzim. Enzim yang diuji stabilitasnya masih dalam bentuk larutan (supernatan). Perubahan stabilitas enzim protease selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik Hubungan antara Waktu Penyimpanan dengan Aktivitas Relatif Enzim

Dari Gambar 2, terlihat bahwa aktivitas enzim menurun dengan bertambahnya waktu penyimpanan. Menurut Suhartono dkk. (1994), enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus stearothermophilus* relatif kurang tahan simpan atau kurang stabil. Protease dari *Bacillus subtilis* aktivitasnya hanya terlihat hingga hari ke-32 sedangkan protease yang diproduksi dari *Bacillus stearothermophilus* pada awal percobaan aktivitasnya adalah 0,059 Unit/ml dan pada hari ke-12 aktivitasnya menjadi 0,046 Unit/ml atau aktivitas relatifnya menjadi 77,966 %. Pada penelitian ini diketahui protease yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 pada awal percobaan, aktivitasnya adalah 0,431 Unit/ml dan pada hari ke-12 aktivitasnya menjadi sebesar 0,171 Unit/ml atau aktivitas relatifnya menjadi 39,7%; yang berarti stabilitasnya lebih rendah dari *Bacillus stearothermophilus*. Penurunan aktivitas pada hari ke 12 sebesar 39,7 % menunjukkan bahwa protease tersebut

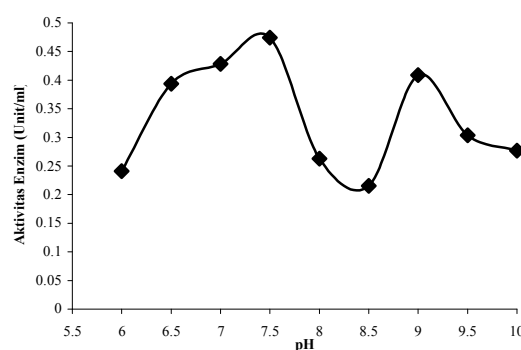
memiliki stabilitas penyimpanan yang rendah.

Kemungkinan-kemungkinan penyebab stabilitas penyimpanan yang rendah atau terjadinya penurunan aktivitas pada saat enzim disimpan, antara lain:

1. Enzim protease hanya aktif secara katalitik dalam jangka waktu yang pendek karena adanya autolisis. Autolisis adalah proses dimana enzim protease mengkatalis hidrolisis protein enzim protease yang sama, misalnya tripsin menghidrolisa molekul tripsin lainnya (Suhartono, 1989).
2. Enzim ini berbentuk larutan dan air berfungsi sebagai medium untuk substrat berdifusi ke dalam sisi aktif enzim dan produk berdifusi dari sisi aktif enzim, sehingga dengan adanya air akan lebih mempermudah enzim mengalami degradasi oleh enzim lain (protease) sehingga enzim yang berbentuk larutan lebih tidak stabil daripada enzim yang telah dikeringkan Fox (1991).

pH

Aktivitas enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 pada variasi pH inkubasi 6,0 - 10,0 dengan kondisi suhu 40°C selama 10 menit dapat dilihat pada Gambar 3.

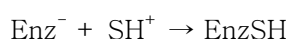


Gambar 3. Grafik Hubungan antara pH dengan Aktivitas Enzim Protease

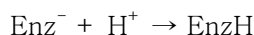
Dari Gambar 3, diketahui bahwa terdapat dua titik puncak yang merupakan pH optimum yaitu pH 7,5 dan 9,0; sehingga dapat diduga ada dua jenis enzim yang

terdapat dalam larutan enzim. Hal ini terjadi karena larutan enzim protease yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak enzim kasar yang belum mengalami tahap pemurnian sehingga pada pH 7,5 salah satu enzim protease (netral) bekerja dengan optimal, sedangkan pada pH 9,0 enzim protease (alkali) yang lain bekerja dengan optimal.

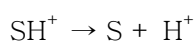
Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, karena pH mempengaruhi keadaan muatan listrik substrat atau enzim. Perubahan muatan dapat mempengaruhi aktivitas, baik dengan perubahan struktur maupun dengan perubahan muatan pada residu asam amino yang berfungsi mengikat substrat atau terjadi katalisis. Misalnya enzim bermuatan negatif (Enz^-) bereaksi dengan substrat (SH^+):



Pada nilai pH kurang dari 7,5 untuk protease netral atau kurang dari 9 untuk protease alkali, Enz^- akan diprotonasi dan kehilangan muatan negatifnya.



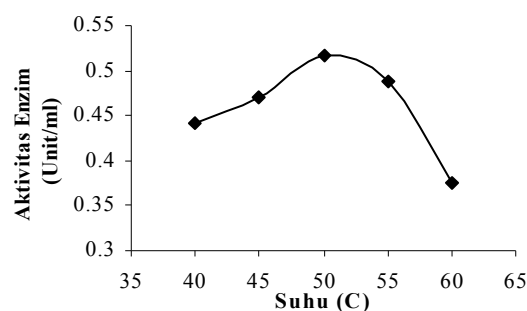
Pada nilai pH lebih dari 7,5 untuk protease netral atau lebih dari 9 untuk protease alkali, SH^+ akan terionisasi dan kehilangan muatan positifnya.



Jadi nilai pH yang lebih rendah atau lebih tinggi akan menurunkan konsentrasi Enz^- dan SH^+ , padahal yang bereaksi adalah Enz^- dan SH^+ sehingga akan menurunkan kecepatan reaksi (Martin *et al.*, 1983).

Suhu

Penentuan suhu optimum pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan uji aktivitas enzim pada suhu yang bervariasi yaitu suhu 40, 45, 50, 55, 60 °C dan dilakukan dengan menggunakan pH 7,5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Hubungan antara Suhu dan Aktivitas Enzim Protease

Pada gambar di atas terlihat bahwa pada suhu 50°C aktivitas enzim yang paling besar, berarti enzim protease diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 memiliki suhu optimum 50°C. Suhu optimum tersebut sama dengan protease metal murni yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* GP 227 (Rufo *et al.*, 1990).

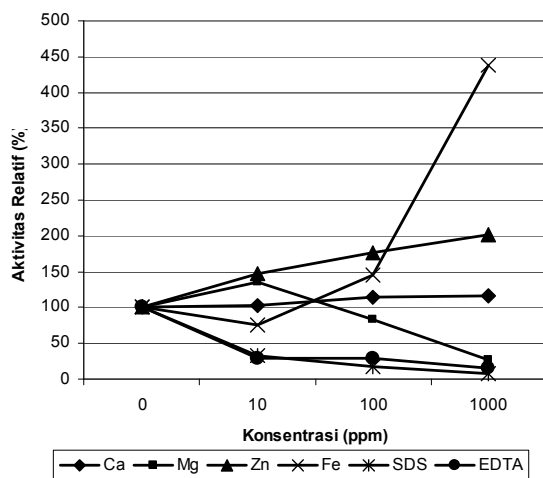
Peningkatan suhu pada suatu reaksi berhubungan dengan bertambahnya energi kinetik molekul, baik molekul enzim maupun molekul substrat. Dengan energi kinetik yang lebih besar justru akan mempercepat gerakan-gerakan vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat molekul sehingga kontak antara substrat dan enzim dapat terjadi dengan frekuensi yang lebih banyak (Suhartono, 1989).

Namun energi kinetik molekul-molekul enzim menjadi demikian besar sehingga melampaui energi untuk memecahkan ikatan-ikatan sekunder (ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, ikatan elektrostatis) yang mempertahankan enzim dalam keadaan alaminya, dimana enzim akan kehilangan struktur tiga dimensi sehingga enzim akan kehilangan kemampuan katalitik pada suhu reaksi yang lebih tinggi dari suhu optimumnya (Martin *et al.* 1983).

Aktivator dan Inhibitor

Aktivator dan inhibitor yang digunakan pada penelitian ini adalah Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , SDS dan EDTA, yang masing-masing diukur dengan variasi konsentrasi 10, 100, 1000 ppm. Pengaruh penambahan aktivator dan inhibitor terhadap aktivitas relatif

enzim protease dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik Hubungan antara Penambahan Konsentrasi Aktivator dan Inhibitor dengan Aktivitas Enzim Protease

Pada grafik di atas, terlihat pertambahan konsentrasi ion Ca^{2+} tidak berpengaruh secara nyata terhadap aktivitas relatif enzim. Jika dibandingkan dengan kontrol juga tidak memberikan pengaruh yang nyata meski dengan penambahan 1000 ppm ion Ca^{2+} . Hal ini dapat dinyatakan bahwa ion Ca^{2+} kurang berperan sebagai aktivator pada enzim protease netral, namun dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas enzim (Endo, 1962 dalam Rose, 1980).

Dapat disimpulkan bahwa enzim dapat distabilkan dengan penambahan ion kalsium karena inaktivasi enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi ikatan kalsium. Parameter aktivitas untuk inaktivasi menunjukkan penguraian protein enzim saat pemanasan. Nilai entalpi aktivitas dan entropi akan meningkat dengan peningkatan konsentrasi ion kalsium. Model kinetik inaktivasi didasarkan pada asumsi bahwa dua tahap penguraian transisi dimana disosiasi ion bivalen terjadi pada tahap pertama dan kemudian diikuti tahap kedua yaitu penguraian struktur. Model kinetik tersebut menginterpretasikan ikatan ion kalsium terhadap protein enzim secara kuantitatif maupun kualitatif dan pengaruhnya terhadap inaktivasi. Afinitas entalpi yang

kuat semakin memperkuat ikatan ion bivalen terhadap protein enzim sehingga bersifat sebagai penstabil (Hoshino and Tanaka, 2002).

Pengaruh ion Mg^{2+} terhadap aktivitas enzim protease netral berbeda dengan ion lainnya. Jika dilihat pada Gambar 5 dengan penambahan konsentrasi ion logam cenderung akan meningkatkan aktivitas enzim protease kecuali ion Mg^{2+} , ion Mg^{2+} pada enzim ini berperan sebagai inhibitor karena dengan penambahan 1000 ppm ion Mg^{2+} menurunkan aktivitas enzim hingga 27,7%.

Penggunaan ion Zn^{2+} sebagai aktivator memberikan peningkatan aktivitas relatif enzim dengan semakin bertambahnya konsentrasi ion Zn^{2+} . Bila dibandingkan dengan kontrol, penambahan 10 ppm ion Zn^{2+} tidak memberikan pengaruh secara nyata terhadap peningkatan aktivitas enzim namun pada penambahan 100 ppm ion Zn^{2+} pengaruh tersebut terlihat nyata dan peningkatan aktivitas sebesar dua kali terjadi pada penambahan 1000 ppm Zn^{2+} .

Penambahan ion Fe^{2+} juga meningkatkan aktivitas enzim. Bahkan pada penambahan ion Fe^{2+} 1000 ppm terjadi peningkatan aktivitas enzim lebih dari empat kali aktivitas kontrol. Peran ion Fe^{2+} ini juga sama dengan ion Zn^{2+} yaitu sebagai aktivator. Dari indikasi ini diduga protease dari *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 termasuk ke dalam protease metal.

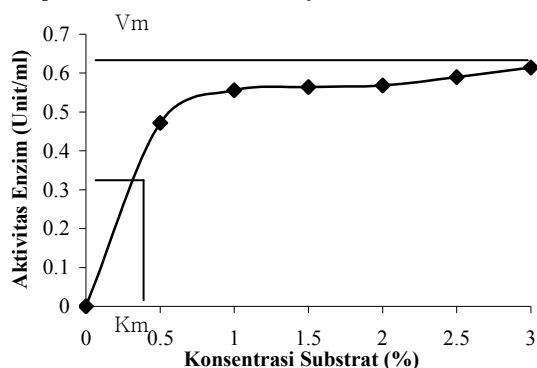
EDTA menurunkan aktivitas enzim protease secara nyata. Hal ini mengindikasikan ion logam divalen dibutuhkan untuk aktivitas enzim protease sebagai kofaktor (Kim, *et al*, 2005).

Penambahan SDS yang merupakan detergen menurunkan aktivitas enzim, tetapi peran SDS bukan untuk mengikat logam, melainkan mendenaturasi protein enzim. Sehingga jika dilihat pada Gambar 5, pada konsentrasi 100 dan 1000 ppm SDS dapat menurunkan aktivitas enzim lebih besar daripada EDTA. Hal ini karena diduga pada larutan ekstrak kasar enzim protease tidak hanya protease metal saja yang ada tetapi juga ada protease lain yang aktivitasnya tidak terhambat oleh EDTA.

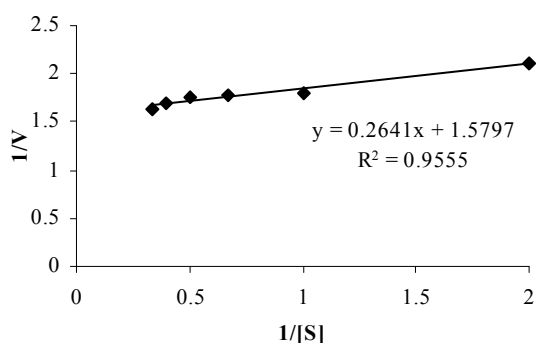
Sedangkan SDS mempunyai kemampuan untuk mendenaturasi semua jenis protein enzim.

Konstanta Kinetika

Penentuan nilai K_m dan V_m dapat dilakukan dengan cara mengukur aktivitas enzim dengan menggunakan substrat dengan konsentrasi bervariasi yaitu 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 %. Pada penelitian ini dilakukan dua kali seri penentuan K_m dan V_m , karena pada penentuan pH optimum didapatkan dua titik puncak yaitu pada pH 7,5 dan 9,0 sehingga pH tersebut digunakan pada pengujian K_m dan V_m . Suhu yang digunakan adalah 50°C, suhu optimum untuk kedua jenis enzim.



Gambar 6. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Substrat dengan Aktivitas Enzim Protease Netral

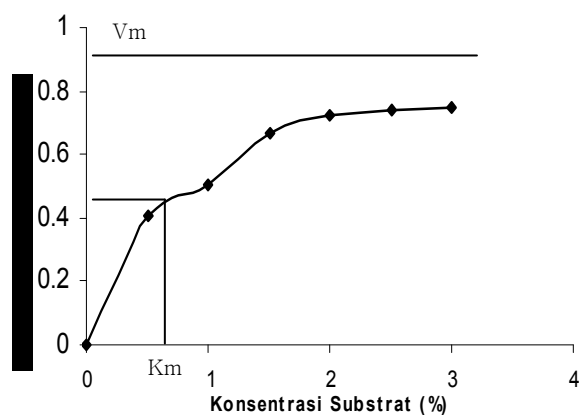


Gambar 7. Grafik Persamaan Lineweaver-Burk (Protease Netral)

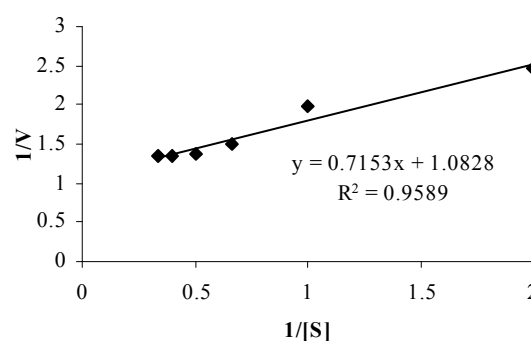
Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim protease pada pH 7,5 (protease netral) dapat dilihat pada Gambar 6 dan Grafik Lineweaver-Burk dapat dilihat pada Gambar 7.

Pada grafik di atas, dapat diketahui persamaan regresi linear yang diperoleh adalah $y = 0,2641 x + 1,5797$; dimana $y=1/V$ dan $x=1/[S]$ sehingga persamaan tersebut menjadi $1/V = 0,2641 1/[S] + 1,5797$. Dari persamaan tersebut didapatkan nilai V_m ialah 0,633 Unit/mL sedangkan K_m ialah 0,167 %.

Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan K_m dan V_m pada kondisi pH 9,0 yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 8 dan Grafik Lineweaver-Burk dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 8. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Substrat dengan Aktivitas Enzim Protease Alkali



Gambar 9. Grafik Hubungan antara 1/V dengan 1/[S] (Protease alkali)

Pada grafik Lineweaver-Burk dengan menggunakan pH 9,0 dapat diketahui persamaan liniernya yaitu $y = 0,7153 x + 1,0828$ dimana $y=1/V$ dan $x=1/[S]$ sehingga persamaan tersebut menjadi $1/V$

= $0,7153 \frac{1}{[S]} + 1,0828$. Dari persamaan tersebut didapatkan nilai V_m ialah 0,924 Unit/mL dan nilai K_m ialah 0,661 %.

V_m (maximum velocity) merupakan kecepatan maksimum reaksi enzim pada saat konsentrasi substrat dalam keadaan jenuh. Berarti kecepatan maksimum reaksi enzim protease netral pada saat konsentrasi substrat jenuh adalah 0,633 Unit/ml sedangkan pada enzim protease alkali 0,924 Unit/ml.

K_m (konstanta Michaelis-Menten) adalah konsentrasi substrat yang dibutuhkan pada saat setengah reaksi maksimum. Berarti konsentrasi substrat (kasein) yang dibutuhkan agar mencapai setengah reaksi maksimum pada protease netral adalah 0,167 % sedangkan pada protease alkali adalah 0,661 %.

KESIMPULAN

Enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 kurang stabil dalam suhu penyimpanan (4°C). pH optimum enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 adalah pH 7,5 (protease netral) dan 9,0 (protease alkali) sehingga diduga terdapat 2 jenis protease.

Suhu optimum enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 adalah 50°C sehingga kedua jenis enzim mempunyai pH optimum yang sama. Penambahan ion Ca^{2+} berfungsi sebagai stabilisator, Zn^{2+} , Fe^{2+} berfungsi sebagai aktivator, sedangkan Mg^{2+} , SDS, dan EDTA berfungsi sebagai inhibitor. Protease netral (pH optimum 7,5) memiliki nilai K_m = 0,167 % dan nilai V_m = 0,633 Unit/mL, sedangkan protease alkali (pH optimum 9,0) memiliki nilai K_m = 0,661 % dan V_m = 0,924 Unit/mL.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai : Penentuan berat molekul enzim protease dengan metode Native-PAGE atau Zimogram, sekaligus untuk mengetahui berapa jumlah protein enzim yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B- 14396. Pemurnian enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-

14396 untuk meningkatkan aktivitas protease dan agar siap digunakan dalam industri. Scale-up untuk memproduksi enzim protease dari *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396 dalam skala industri. Penerapan imobilisasi enzim protease yang diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B- 14396.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini dibiayai dan difasilitasi oleh Pusat Penelitian Pabrik Gula Indonesia. Untuk itu peneliti mengucapkan terima kasih kepada instansi terkait atas kepercayaannya kepada kami untuk melakukan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K., P. Ellaiah, and D.S. Prasad. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable of Serine Alkaline Protease from Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. AAPS PharmSciTech Volume 4. Nomor 56. Visakhapatnam. India.
<http://www.aapspharmscitech.org/pt0404/pt040456.pdf>. Tanggal akses 16 Januari 2004. Jam 13:01.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibson. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8 th edition. Williams and Wilkins. Baltimore. dalam Rose, A.H. 1980. Economic Microbiology Volume 5. Microbial Enzymes and Bioconversions. Academic Press. London.
- Choi, N.S. and S.H. Kim. 2000. The Effect of Sodium Chloride on The Serine-type Fibrinolytic Enzymes and the Thermostability of Extracellular Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ4. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Volume 34. Nomor 2. Korea.
- Chao, S.H., et al. 2006. Characterization of A Novel PepF-Like Oligopeptidase Secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A. Applied and Environmental Microbiology. Volume 72. Nomor 1. Taiwan.
- Endo, S. 1962. Journal of Fermentation Technology 40 dalam Rose, A.H. 1980. Economic Microbiology Vol. 5.

- Microbial Enzymes & Bioconversions. Academic Press. London.
- Fox, P.F. 1991. Food Enzimology. Volume I. Elsevier Applied Science. New York.
- Harper, H.A. 1971. Review of Physiological Chemistry. Marujen Company Limited. Jepang.
- Hoshino, E. and A. Tanaka, 2002, Calsium Binding Parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase Determined by Inactivation Kinetics, Biochemistry Journal, page 635-639.
- Kim. J.I. 2003. Characterization of Endopeptidase of *Bacillus amyloliquefaciens* S94 by Chemical Modification. The Journal of Microbiology. Volume 39. Nomor 4. Korea.
- Kim, J.I., S.M. Lee and H.J. Jung. 2005. Characterization of Calcium-Activated Bifunctional Peptidase of the Psychrotrophic *Bacillus cereus*. The Journal of Microbiology. Volume 43. Nomor 3. Korea.
- Leewit, S. and Pornsukawang. 1988. Protease from Bacteria in Soybean Whey In Proc. Food Science and Technology in Industrial Development Volume 1. Thailand dalam Yunita A. 2000. Pengaruh Metode Ekstraksi Enzim Renin *Mucor pusillus* Sebagai Pengganti Rennet Sapi terhadap Kualitas Keju Gouda. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Martin, D.W., P.A. Mayes, and V.W.Rodwell. 1983. Harper's Review of Biochemistry. Large Medical Publication. California.
- Rao, M.B., A.M. Tanksal, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease. Microbiology and Molecular Biology Reviews. India. <http://mmbbr.asm.org/cg/content/full/62/3/597#FN151.html>. Tanggal akses 4 Maret 2004. Jam 07:40.
- Rose, A.H. 1980. Economic Microbiology Volume 5. Microbial Enzymes and Bioconversions. Academic Press. London.
- Rufo, G.A., B.J. Sullivan, A.Sloma, and J. Pero. 1990. Isolation and Characterization of a Novel Extracellular Metalloprotease from *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. Volume 172. Nomor 2. Massachusetts.
- <http://www.Pubmedcentral.nih.gov/pagerender.fcgi?artid=208532>. Tanggal akses 6 April 2004. Jam 9:46.
- Saraswati, D. 1992. Prospek Pengembangan Bioteknologi di Indonesia dalam makalah Seminar Bio teknologi Industri. Institut Teknologi 10 November. Surabaya dalam Nuraini, A. D. 2002. Isolasi dan Karakterisasi enzim protease dari *Bacillus laterosporus*. Skripsi Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Son, E.S., and J.I. Kim. 2002. Purification and Characterization of Caseinolytic Extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* S94. The Journal of Microbiology. Volume 40. Nomor 1. Korea.
- <http://www.msk.or.kr/jsp/viewoldjournal.jsp?paperseq=138>. Tanggal akses 30 Desember 2003. Jam 8:50.
- Son, E.S., and J.I. Kim. 2003. Multicatalytic Alkaline Serine Protease from the Psychrotropic from *Bacillus amyloliquefaciens* S94. The Journal of Microbiology. Volume 41. Nomor 1. Korea.
- Stanburry, P.F., and A. Whittaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press. Ltd. Oxford.
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suhartono, M. T., N. Andarwulan, I. Malikh dan Mariani. 1994. Daya Tahan Simpan Protease. Buletin Teknologi dan Industri Pangan. Volume 5. Nomor 3.