



**AMOBILISASI SEL DAN ISOLASI TERMOENZIM
PROTEASE DARI BAKTERI TERMOFIL ISOLAT
SUMBER AIR PANAS RIMBO PANTI**

TESIS



OLEH

**BUSMAN
99 207 013**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
2002**

Amobilisasi Sel dan Isolasi Termoenzim Protease dari Bakteri Termofil Isolat Sumber Air Panas Rimbo Pantii

Oleh : Busman

(di bawah bimbingan Abdi Dharma, Sumaryati Syukur)

RINGKASAN

Mikroorganisme termasuk bakteri mempunyai kemampuan adaptasi yang lebih baik terhadap lingkungan dibandingkan dengan organisme multiseluler sehingga mampu hidup pada tempat-tempat ekstrim seperti pada suhu, salinitas dan pH ekstrim. Bakteri termofil merupakan bakteri yang dapat hidup pada habitat yang mempunyai suhu lebih besar dari 45 °C seperti pada sumber air panas. Di lingkungan yang panas tersebut, bakteri dapat bertahan hidup dengan melakukan penyesuaian-penyesuaian yang fundamental terhadap struktur, mekanisme biokimiawi dan genetik. Secara fisiologis, bakteri termofil mampu memberikan respon untuk memproduksi enzim yang resisten terhadap denaturasi pemanasan, salah satunya adalah enzim protease yang kegunaannya antara lain untuk campuran detergen, pembuatan roti, keju dan sejumlah produk biomedis.

Dalam memproduksi enzim, metoda amobilisasi sel bakteri merupakan hal yang menarik dan telah banyak dilakukan karena bakteri yang dijebak dalam suatu matrik, menunjukkan stabilitas enzim yang lebih baik dari pada enzim yang bersumber dari bakteri sel bebas.

Sumber air panas Rimbo Panti (suhu ± 82 °C) merupakan habitat bakteri termofil penghasil termoenzim, diantaranya protease. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang amobilisasi sel dan isolasi termoenzim protease dari bakteri termofil isolat sumber air panas Rimbo Panti Pasaman.

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut: (1). Menentukan aktivitas relatif enzim protease dari isolat bakteri termofil sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. (2). Menentukan kondisi optimum aktifitas enzim meliputi keasaman (pH), suhu, waktu inkubasi, konsentrasi substrat, inhibitor dan kinetika enzim protease yang diproduksi oleh isolat bakteri termofil sumber air panas tersebut. (3). Mempelajari teknik amobilisasi sel dan efisiensinya dibandingkan dengan non amobil (bakteri sel bebas). Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei 2001 sampai bulan Januari 2002 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi dan laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Univeristas Andalas Padang sedangkan identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Pusat Koleksi Mikroorganisme Balitbang-Puslitbang LIPI Bogor dan di Laboratorium Bakteriologi Balai Penyelidikan Penyakit Hewan Wilayah II Baso Bukit Tinggi.

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Isolasi, seleksi, identifikasi dan menentukan indek proteolitik (IP) bakteri penghasil enzim protease dari isolat sumber air panas Rimbo Panti.
2. Untuk memproduksi enzim protease, isolat bakteri termofil diamobilisasi dengan barium-alginat.

3. Enzim protease yang bersumber dari bakteri sel teramobil di tentukan kondisi optimumnya (karakterisasi enzim) meliputi pH, suhu, waktu inkubasi, konsentrasi substrat kasein, inhibitor, kinetika enzim dan selanjutnya dibandingkan dengan kondisi optimum enzim protease yang bersumber dari bakteri sel bebas. Aktifitas enzim diuji dengan metoda Anson. Selain itu, juga diuji pengaruh kalsium, barium terhadap aktifitas relatif, pengaruh suhu terhadap stabilitas relatif dan pengaruh suhu terhadap pemulihan aktifitas enzim.
4. Konsentrasi protein preparat enzim protease ditentukan dengan metoda Lowry.

Hasil penelitian diperoleh 5 isolat bakteri yang potensial penghasil enzim protease yakni *Bacillus cereus*, *Alcaligenes* sp1, *Alcaligenes* sp2, *Bacillus brevis* dan *Bacillus* sp1, dan yang paling potensial sebagai penghasil enzim protease adalah *Bacillus cereus* dengan indek proteolitik (IP) 2,75 cm dan bakteri ini digunakan untuk penelitian selanjutnya. Konsentrasi barium-alginat 4 % adalah konsentrasi terbaik untuk mengamobilisasi bakteri *B. cereus* dan waktu fermentasi terbaik adalah 108 jam.

Kondisi optimum enzim protease yang bersumber dari bakteri sel teramobil maupun dari bakteri sel bebas sama-sama terletak pada pH 8,0, suhu 50°C, waktu inkubasi 10 menit dan konsentrasi substrat kasein 3%. Aktifitas enzim dari sel teramobil pada kondisi optimum didapatkan 7,170 unit sedangkan sel bebas adalah 5,105 unit. Penyimpangan diluar kondisi optimum, enzim protease yang

bersumber dari bakteri sel teramobil memperlihatkan aktifitas relatif yang lebih baik dari pada enzim yang bersumber dari bakteri sel bebas.

Inhibitor EDTA 10 mM dan FMSF 4 mM dapat menghambat aktifitas termoenzim protease berturut-turut sebesar 24,25 % dan 22,14 % sedang kombinasinya dapat menghambat aktifitas enzim sampai 100 %. Dari nilai penghambatan ini disimpulkan bahwa enzim protease dari *Bacillus cereus* adalah campuran metalo protease dan serin protease.

Ion kalsium dan barium dengan konsentrasi 10 mM dapat meningkatkan aktifitas relatif termoenzim protease berturut-turut sebesar 121,4 % dan 118,6 %. Pengaruh ion [Ca^{2+} dan Ba^{2+}] terhadap kestabilan relatif enzim oleh suhu tinggi (90°C) adalah 78,5 % dan 67,3 %.

Harga K_m dan V_{mak} dari enzim protease yang bersumber dari bakteri sel teramobil berturut-turut adalah 0,220 dan 6,290, sedangkan yang bersumber dari bakteri sel bebas sebesar 0,166 dan 5,687. Pemulihan aktifitas termoenzim protease yang bersumber dari bakteri sel teramobil mencapai 73,74 %.

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Mikroorganisme termasuk bakteri, mempunyai kemampuan adaptasi yang lebih baik terhadap lingkungan dibandingkan dengan organisme multiseluler, sehingga mikroorganisme mampu hidup dan dapat ditemukan pada tempat-tempat ekstrim seperti pada suhu, salinitas, pH yang relatif tinggi atau rendah, yang bagi organisme lain tidak dapat hidup. Mikroorganisme yang mampu hidup pada lingkungan ekstrim ini disebut ekstrimofil dan enzimnya disebut ekstrimoenzim (Adams & Kelly, 1995; Lestari, 1999).

Bakteri yang mampu tumbuh dan hidup pada lingkungan panas seperti di sumber-sumber air panas (hot springs) dikenal sebagai bakteri termofil atau 'heat-loving'. Berdasarkan suhu pertumbuhan maksimalnya, bakteri termofil digolongkan kedalam bakteri termofil fakultatif (50-65 °C), termofil obligat (65-70 °C), termofil ekstrim (70-80 °C) dan hipertermofil (80-110 °C). Diantara bakteri termofil, beberapa strain *Bacillus* mempunyai kisaran suhu habitat yang relatif luas yakni dari suhu dibawah 30 °C sampai 85 °C misalnya *Bacillus subtilis* (45-55 °C), *B. coagulans* (55-65°C), *B. caldarius* (70 °C), *B. stearothermophilus* (70-75 °C), *B. caldolyticus* (82 °C), *B. caldotenax* (85 °C). Mikroorganisme lainnya yang juga ditemukan pada sumber air panas adalah strains *Closteridium* (67-70 °C), *Thermoactinomyces vulgaris* (70 °C), *Thermomicrobium roseum* (85 °C), *Desulfovibrio thermoflavus* (85 °C) dan *Thermatoga maritima* (90 °C) (Friedman, 1992; Adams & Kelly, 1995). Menurut Edwards (1990), sifat yang dimiliki oleh mikroorganisme untuk bertahan hidup pada suhu tinggi, dilakukan dengan

penyesuaian-penyesuaian yang fundamental terhadap struktur, mekanisme biokimiawi dan genetiknya.

Berbagai mikroorganisme seperti bakteri, kapang dan jamur dapat memproduksi enzim protease. Dari golongan bakteri, yang dapat memproduksi enzim protease adalah *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Closteridium* dan *Serratia*, dari golongan kapang seperti *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces* dan *Mukor* (Suhartono, 1989; Adams & Kelly, 1993).

Mikroorganisme termofil merupakan kelompok mikroorganisme yang paling banyak diteliti diantara mikroorganisme ektrimofil. Kristjanson dan Alfredson (1983), mengisolasi *Thermus* spp. pada sumber air panas di Islandia. Storm (1985), mengidentifikasi bakteri termofil pada limbah padat-panas. Kasrina dan Darwis (1998) di sumber air panas Desa Air Putih Bengkulu. Wahyutari, Suhartono dan Pyun (2000), meneliti sifat-sifat protease ekstraseluler dari mikroorganisme termofil yang disolasi dari Kawah Tangkuban Perahu. Di lingkungan yang ekstrim tersebut, mikroorganisme dapat menghasilkan enzim yang sifat-sifatnya menguntungkan, misalnya menghasilkan protease yang tahan suhu tinggi. Menurut Oshima (1980) serta Dawes dan Sutherland (1976 *cit.* Sumardi, 1995) mikroorganisme yang tahan suhu tinggi secara fisiologis memberikan respon untuk membentuk enzim yang juga tahan suhu tinggi.

Mikroorganisme seperti bakteri telah banyak dimanfaatkan dalam bioteknologi, industri kimia dan farmasi. Bakteri telah digunakan untuk memproduksi berbagai senyawa kimia yang merupakan hasil dari metabolisme (Whitaker & Stanbury, 1984). Potensi penggunaan bakteri termofil memiliki beberapa kelebihan dibandingkan bakteri-bakteri non termofil yang digunakan

saat ini (Lacey, 1990). Kelebihan-kelebihan tersebut antara lain dapat menghasilkan berbagai senyawa kimia dalam jumlah yang lebih banyak dengan waktu yang relatif singkat, mengurangi resiko kontaminasi, mengurangi biaya pendinginan dalam sistem produksi, menurunkan viskositas media pertumbuhan dan meningkatkan kelarutan dari berbagai molekul anorganik dan organik (Edwards, 1990).

Pemanfaatan bakteri termofil yang tidak kalah penting dalam bioteknologi adalah sebagai sumber termoenzim (Doing, 1980). Salah satu enzim yang dihasilkan bakteri termofil adalah enzim protease yang penggunaannya antara lain untuk campuran detergen, pembuatan roti, keju, berbagai olahan susu dan sejumlah produk biomedis (Suhartono, 1996).

Dalam memproduksi enzim, metoda amobilisasi sel mikroba merupakan hal yang menarik karena mikroba yang dijebak dalam suatu matrik, menunjukkan stabilitas enzim yang lebih tinggi dari pada sel mikroba dalam keadaan bebas. Amobilisasi mikroba dengan metoda penjebakan dapat menggunakan matrik agar gel, poliakrilamid, k-carragenan dan alginat (Chibata, Tosa dan Sato, 1985).

1.2. Perumusan Masalah

Indonesia merupakan salah satu negara vulkanis yang mempunyai banyak gunung berapi dan sumber air panas, yang selama ini hanya untuk pariwisata, namun hampir tidak dimanfaatkan untuk kepentingan bioteknologi. Sumatera Barat banyak ditemukan sumber air panas yang tersebar seperti di Pariangan Tanah Datar, Koto Baru Agam, Sumani, Muaro Labuh, Aie Angek Sijunjung, Kota Baru Solok (suhu ± 60 °C) dan di Rimbo Panti Pasaman (suhu ± 82 °C).

V. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian tentang "amobilisasi sel dan isolasi termoenzim protease dari bakteri termofil isolat sumber air panas Rimbo Panti" dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Diperoleh 5 isolat bakteri yang potensial untuk memproduksi enzim protease dan nilai indek proteolitik (IP) yaitu *Bacillus cereus* (2,75 cm), *Alcaligenes* sp1 (2,6 cm), *Alcaligenes* sp2 (2,4 cm), *Bacillus brevis* (2,3 cm) dan *Bacillus* sp1 (2,1 cm) dan yang paling potensial adalah bakteri *Bacillus cereus*
2. Konsentrasi barium-alginat 4 % merupakan konsentrasi terbaik untuk mengamobilisasi bakteri *Bacillus cereus*.
3. Enzim protease yang bersumber, baik dari bakteri sel teramobil maupun dari bakteri sel bebas, sama-sama mempunyai aktifitas optimum pada pH 8,0, suhu 50 °C, waktu inkubasi 10 menit dan konsentrasi substrat kasein 3 % serta mempunyai nilai V_{max} dan K_m masing-masing sebesar 6,290 dan 0,220 untuk enzim yang bersumber dari bakteri teramobil, sedangkan dari bakteri sel bebas masing-masing sebesar 5,687 dan 0,166.
4. Enzim protease yang bersumber dari bakteri teramobil lebih stabil terhadap penyimpangan pH dan suhu diluar pH dan suhu optimum.
5. Enzim protease dari isolat sumber air panas Rimbo Panti berupa campuran enzim metalo protease dan serin protease.

SARAN-SARAN

1. Untuk memproduksi enzim dari isolat sumber air panas, agar dilakukan pada suhu alami dimana mikroorganisme itu hidup dan berkembang.
2. Untuk meningkatkan produksi enzim, perlu dilakukan rekayasa genetik terhadap bakteri tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M.W. W., R. M. Kelly, 1995. Enzymes from Microorganisms in Extreme Enviroments. Special Report.
- Bressollier,L., F. Letourneau., M. Urdaci., B. Verneuil, 1999. Purification and Characterization of keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. J. App. and env. Microbiol. Vol 65 No.6: 2570-2576.
- Calik. G., H.Savesci., P.Calik., T.H. Ozdamar (1999). Growth and k-carageenan Immobilization of *Pseudomonas dacunhae* cells for l- Alanin Production. Enz. and Micro. Tech. 24. Elsevier Science Inc. Hal. 67-74. New York.
- Chibata.I., T. Tosa., T. Sato, 1985. Methods of cell immobilization. Dalam A.L. Demain, Solomon. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology vol. 53. Chap 18. Hal. 218-223.
- Ciani, M., L. Ferraro (1998). Combine Use of Immobilized *Candida stella* cells and *Sacharomyces cerevisiae* to Improve the Quality of Wine. J. App. Microbiol. 85. Hal. 247-254
- Conn, J.D., D. Tsuru., K. Yasunobu, (1964). *Bacillus subtilis* Neutral Proteinase. A. Zinc Enzyme of High Spesific Activity. The J. Biochem Vol. 239 No. 11. Hal 3706-3715
- Dirnawan, H., A. Suwanto., T. Purwadaria, 2000. Eksplorasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler dari Sumber Air Panas Gunung Pancar . Hayati Vol 7, No 2 . Hal: 52-55.
- Doing, Jr. A.R, 1980. Stability of Enzyme from Thermophilic Microorganism. In Enzyme engineering, Vol 2 (ed) E.K. Dye L.B., Wingard Jr. Plenum Press, New York . Hal. 17-22
- Edwards, C. 1990. Thermophiles. In Microbiology of Extreme (ed). C. Edwards. Mc Graw-Hill, New York. Hal. 1-32
- Fardiaz, 1989. Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan, Penerbit IPB-Bogor.
- Fogarty, W.M., R.M. Kelly, 1979. Developments in Microbial Extraselluar Enzyme, in A. Wisman (eds.), Enzyme and Fermentation Biotechnology, Vol III, Jhon Willey and Sons, New York.
- Friedman, S.M, 1992. Thermophilic Microorganisms. Encyclopedia of Microbiology. Vol 4. 217-229. Academic Press Inc. New York.