# AMOBILISASI SEL BAKTERI *BACILLUS CEREUS* TERMOFILIK UNTUK PRODUKSI PROTEASE

**Abdi Dharma**[1)], dan Busman[2)]
[1)]Laboratorium Biokimia Universitas Andalas
[2)]Laboratorium Biokimia Universitas Baiturrahmah Padang

## INTISARI

Bakteri proteolitik *Bacillus cereus* isolat dari sumber air panas Rimbo Panti telah diamobilisasi secara penjebakan dengan barium alginat dari berbagai konsentrasi. Bakteri amobil ini kemudian dikulturkan didalam medium yang mengandung protein. Aktifitas enzim didalam medium selama fermentasi diuji dan ditentukan dengan metoda Anson. Karaker enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri teramobil ini dibandingkan dengan karakter enzim yang dihasilkan oleh sel yang bebas. Data memperlihatkan bahwa aktifitas enzim protease dari sel bebas dan sel amobil sama-sama optimum pada pH 8, suhu 50°C dan waktu inkubasi 10 menit, namun berbeda nilai konstanta kinetikanya. Terhadap substrat kasein, $V_{max}$ dan $K_M$ protease dari sel teramobil adalah berturut turut 6,29 dan 0,22, dan dari sel bebas adalah 5,69 dan 0,17.

*Kata kunci: Bacteria termofilik, protease, sel amobil*

## ABSTRACT

Proteolytic bacterium, *Bacilus cereus* isolated from hot spring Rimbo Panti have been immobilized by entrapping with various concentration of barium alginate. The immobilized cell was cultured in medium containing protein. The activity of enzyme in medium was assayed by method of Anson. The character of enzyme from immobilized cell was compared from the enzyme from the free cells. Data shown that the activity of enzyme both from immobilized and free cells are optimum at pH 8, and 50°C with incubation time 10 minutes, however the kinetic constant of both enzyme are different.
With casein as the substrate, the $V_{max}$ and $K_M$ of protease from immobilized cells was 6,29 dan 0,22 respectively, and from free cells was 5,69 dan 0,17 respectively.

*Keywords: Thermophilic bacteria, protease, immobilized cell*

## PENDAHULUAN

Amobilisasi dari enzim atau mikroba penghasil enzim menyebabkan terjadinya perubahan karakter enzim yang diamobilkan atau enzim yang dihasilkan oleh sel amobil. Perubahan yang terlihat akibat amobilisasi tersebut antara lain kespesifikan substrat, kestabilan, kondisi (pH dan suhu) optimum serta konstanta kinetikanya[1]. Perubahan karakter dari enzim amobil atau enzim yang dihasilkan oleh sel amobil terkadang menguntungkan dan terkadang merugikan dari segi aplikasinya. Peningkatan kestabilan dari enzim yang dihasilkan oleh sel mikroba teramobil sudah teramati pada beberapa kasus [2].

Enzim protease dimanfaatkan oleh berbagai industri mulai dari industri deterjen, kulit, roti, keju, dan berbagai hasil olahan susu dan sejumlah produk biomedis. Pemakaian yang luas ini menyebabkan nilai jual enzim protease mencapai US $ 500 juta pertahun. Di Indonesia, pemakaian enzim termasuk enzim protease semakin meningkat dengan berkembangnya industri pemakai enzim. Nilai import diperkirakan sudah mencapai US $ 6 juta pertahun[3].

Seperti bakteri psychrofil dan mesofil, bakteri termofil juga dapat menghasilkan enzim protease. Imanaka telah mengisolasi enzim ekstraseluler protease dari *Bacillus sp* yang tumbuh pada suhu 62 °C. Bakteri hipertermofil seperti *Pyrococcus furiosus* dan *Thermatoga* yang tumbuh pada suhu 98-100 °C juga dapat menghasilkan enzim amilase dan protease[4]. Dari segi terapan dan bioteknologi, termofil merupakan sumber enzim yang unik dengan sifat yang luar biasa, khususnya yang tahan pada suhu tinggi. Contoh penerapan enzim termostabil yaitu sebagai agens aktif dalam fermentasi suhu tinggi, proses pengolahan limbah dan proses pelarutan mineral[5]. Oleh karena itu menarik untuk diteliti bagaimana produksi enzim protease

secara fermentasi dengan mikroba termofilik amobil.

Amobilisasi mikroba dapat dilakukan dengan metoda penjebakan dengan matrik agar gel, poliakrilamid, k-carragenan dan alginat[2]. Metoda penjebakan sel bakteri secara langsung dalam matriks polimer telah dilakukan secara intensif. Sel amobil memiliki kegunaan yang sangat praktis dalam bidang industri, karena disamping mudah dipisahkan dari campuran medium dan sell, sistem tersebut dapat digunakan lagi untuk produksi berikutnya. Selain itu sel amobil dapat diandalkan pada proses kontinu, baik yang dilaksanakan dalam suatu reaktor tangki yang dilengkapi dengan pengaduk maupun dalam suatu reaktor pipa[6,7]. Telah dilaporkan beberapa amobilisasi sel mikroba untuk memproduksi beberapa metabolit secara fermentasi, seperti amobilisasi sel bakteri amilolitik termopilik *B. stearothermophilus* R1-A dengan kalsium-alginat[8], sel *E. coli* B-130 dengan natrium-alginat 2 % untuk memproduksi asam 6-APA Penisilin G[6], sel *Pseudomonas dacunhae* dengan k-carageenan untuk memproduksi L-alanin[9] dan sel *Pseudomonas putida* untuk biotranformasi senyawa-senyawa aromatik dengan barium-alginat 3 %[7]. Enzim dari sel amobil pada ketiga penelitian ini memperlihatkan aktifitas enzim lebih tinggi dari aktivitas enzim yang bersumber mikroba sel bebas (non amobil).

Disini dilaporkan hasil penelitian tentang produksi termoenzim protease dengan fermentasi oleh bakteri termofil dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman yang diamobilkan dengan barium- alginat.

## BAHAN DAN METODA

Mikroba yang dipakai adalah bakteri proteolitik *Bacillus cereus* isolat dari sumber air panas Rimbo Panti yang hidup pada suhu sekitar 80 °C, pH 8

**Perbanyakan sel bakteri**

Bakteri *Bacillus cereus* ditanam dalam medium fermentasi kasein. Setelah 24-48 jam, sel dipisahkan dari medium fermentasi dengan cara sentrifugasi bertingkat yaitu 1500 rpm selama 10 menit untuk memisahkan sisa-sisa medium yang tidak terfermentasi dan 5000 rpm selama 30 menit untuk memisahkan pelet bakteri dan supernatan. Pellet bakteri diambil dan diamobil. Konsentrasi bakteri dalam 1 ml pellet dihitung dengan metoda pengenceran bertingkat[10].

**Penjebakan bakteri**

Sebanyak 4 ml pelet sel bakteri disuspensikan dengan 6 ml larutan barium-alginat steril 1%, 2%, 3%, 4% dan 5%. Suspensi sel, dengan menggunakan injektor syringe (diameter ± 2 mm), diteteskan ke dalam 500 ml larutan 0,05 M $BaCl_2.2H_2O$ sehingga terbentuk butiran-butiran gel dengan sel teramobil (diameter ± 2-3 mm) yang mengeras setelah 15 menit pada suhu 4 °C membentuk bulatan bead. Butiran-butiran sel yang teramobil kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no.1 selanjutnya dicuci dengan akuades steril atau air distilasi. Terhadap sel teramobil ini dilakukan uji fermentasi. Konsentrasi barium alginat yang menghasilkan aktifitas enzim tertinggi digunakan dalam penjebakkan sel dalam penelitian selanjutnya, dimana 40 ml pelet sel bakteri dicampurkan dengan 60 ml larutan konsentasi natrium-alginat[7].

**Penentuan Waktu Fermentasi**

Fermentasi dengan bakteri sel teramobil dilakukan dengan mencampurkan 2g bakteri teramobil dengan 100 ml medium fermentasi, digoyang dengan kecepatan 200 rpm selama 5 hari. Setelah itu dipanen pada selang waktu 12 jam secara menyaring campuran fermentasi dengan kertas saring Whatman no 1 dan filtrat diambil sebagai preparat enzim kasar. Aktivitas enzim protease dari masing-masing enzim kasar ditentukan dengan metoda Anson [11].

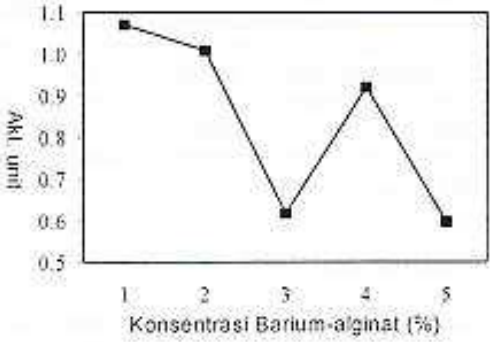
## HASIL DAN DISKUSI

**Konsentrasi optimum Barium-Alginat**

Amobilisasi dengan barium-alginat 4 % memberikan hasil fermentasi yang terbaik yaitu didapatkan aktivitas enzim 0,92 unit. Walaupun pada konsentrasi barium alginat 1% dan 2 % memberikan enzim dengan aktivitas tertinggi, tetapi semua bead hancur sewaktu dilakukan fermentasi (Gambar 1).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa konsentarsi senyawa alginat yang terbaik untuk mengamobilisasi sel bakteri adalah antara 2 sampai dengan 3%. Konsentrasi natrium alginat terbaik untuk amobilisasi bakteri *Bacillus brevis* untuk memproduksi termostabil α-amilase adalah natrium alginat 3%[12], untuk mengamobilisasi *Escherichia coli* B 130 untuk memproduksi asam 6-aminopenisilanat (6-APA) dari penisilin G adalah natrium alginat 2% [6], sedangkan untuk mengamobilisasi *Pseudomonas putida* untuk mendegradasi senyawa fenol adalah dengan kalsium-alginat 3%[13] serta untuk mengamobilisasi *Pseudomonas putida* untuk biotransformasi senyawa aromatik adalah dengan kalsium-alginat 3 %[7] sedangkan untuk mengamobilsasi kombinasi sel *Candida*

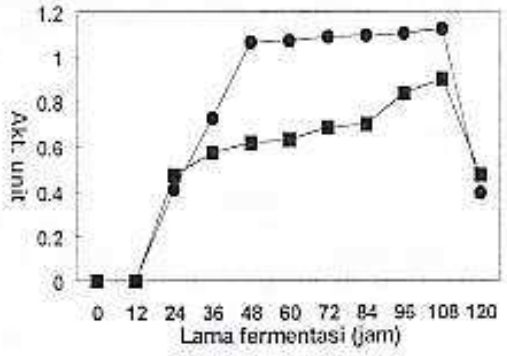
*stella* dan *Saccharomyces cerevisiae* untuk meningkatkan kualitas anggur adalah dengan natrium-alginat 3%[14]. Konsentrasi alginat yang digunakan untuk mengamobilisasi mikroorganisme dipengaruhi oleh jenis mikroorganisme, kecepatan agitasi, diameter bead, suhu, substrat dan berat molekul enzim yang diproduksi[12,13,15].




Gambar 1. Konsentrasi barium-alginat (%) sebagai bahan mengamobilisasi bakteri lama fermentasi 108 jam

**Waktu Inkubasi Fermentasi Sel Bakteri bebas (non Amobil) dan Teramobil.**

Aktifitas enzim protease pada bakteri sel bebas didapatkan tertinggi pada waktu fermentasi 108 jam yakni sebesar 1, 121 unit dan pada bakteri sel teramobil 0,897 unit, yang diproduksi pada akhir fase logaritmik pertumbuhan. Dari 2 liter medium fermentasi bakteri sel bebas diperoleh ekstrak kasar enzim sebanyak 1165 ml sedangkan pada bakteri yang teramobil diperoleh 1235 ml.

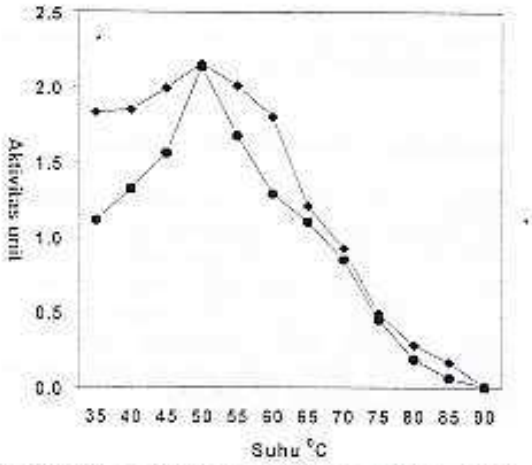



Gambar 2. Aktifitas enzim protease selama fermentasi dengan bakteri sel teramobil (□) dan bakteri sel bebas (♦)

Aktivitas enzim protease rendah pada tahap awal fermentasi, karena bakteri masih dalam masa pertumbuhan, dan maksimum pada jam ke 108, setelah itu menurun dengan tajam karena enzim protease sudah mulai terhidrolisis dan diserap kembali oleh bakteri sebagai sumber makanan (Gambar 2) [14,15].

**pH inkubasi optimum**

pH optimum enzim protease dari bakteri sel teramobil maupun dari bakteri sel bebas adalah pada pH 8,0 dengan aktivitas berturut-turut 1,860 dan 1,832 unit. Aktivitas enzim dari sel amobil pada pH ekstrim seperti pada pH 6 atau 11 terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan aktifitas enzim dari sel bebas (Gambar 3). Enzim-enzim yang berasal dari mikro-organisme teramobil memiliki stabilitas yang lebih baik terhadap pH dari pada enzim dari sel bebas atau sel utuh[15,16].



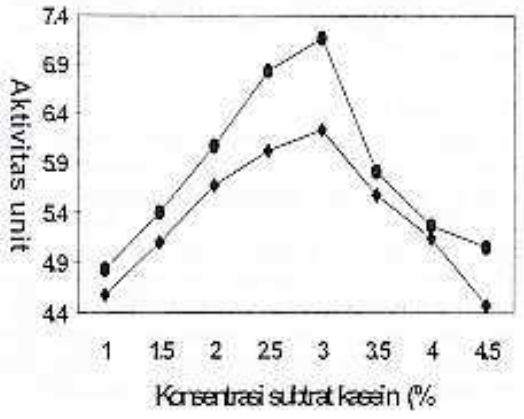

Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim protease dari bakteri sel teramobil (o) dan sel bebas (■) *B. cereus*

**Suhu inkubasi optimum**

Suhu optimum enzim protease baik yang berasal dari bakteri sel teramobil maupun dari bakteri sel bebas adalah 50 °C dengan aktivitas berturut-turut 2,155 dan 2,135 unit dan enzim kehilangan aktivitasnya pada suhu 90 °C (Gambar 4).

Pada suhu diluar suhu optimum terlihat bahwa aktivitas enzim dari sel teramobil lebih tinggi dibandingkan dengan aktifitas enzim dari sel bebas. Enzim-enzim yang berasal dari mikroorganisme teramobil memiliki stabilitas yang lebih baik terhadap suhu dari pada enzim dari sel bebas [16].

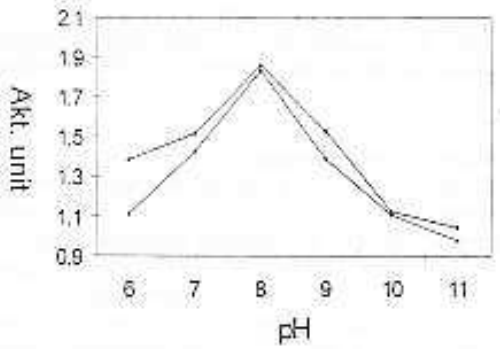
Enzim protease yang dihasilkan oleh *B. cereus* dari isolat sumber air panas Rimbo Panti ini merupakan termoenzim protease karena mempunyai suhu optimum 50 °C. Menurut Dirnawan *et al*.[11], enzim termoaktif dan termostabil merupakan enzim yang aktif dan stabil pada suhu 50-100 °C, tetapi Zeikus *et al*. [15], mendefinisikan termoenzim adalah enzim yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 60-120 °C.




Gambar 4. Kurva suhu inkubasi enzim protease dari sel bakteri teramobil (■) dan sel bakteri (o)

### Konsentrasi substrat kasein optimum

Aktifitas enzim protease dari sel teramobil dan non amobil optimum terhadap kasein dengan konsentrasi 3% (b/v) dengan aktivitas beturut-turut 7,170 dan 6,235 unit. Pada konsentrasi substrat kasein yang lebih rendah atau lebih tinggi, aktivitas enzim protease dari bakteri terambil lebih tinggi dari enzim yang berasal dari bakteri sel bebas (Gambar 5).




Gambar 5. Aktifitas enzim proteasedari sel bakteri *B. cereus* teramobil (o ) dan sel bebas (■) terhadap berbagai konsentrasi (%) dari kasein.

Pada kasus ini terjadinya penurunan aktivitas enzim setelah mencapai konsentrasi substrat optimum. Hal ini mungkin disebabkan molekul substrat berinteraksi dengan kompleks ES membentuk ESS yang mengakibatkan produk yang dihasilkan menurun dan aktivitas yang dihasilkan juga menurun. Menurut Suhartono [10,14], pada beberapa enzim sering terjadinya penghambatan unkompetitif, yang inhibitornya adalah substrat pada tingkat konsentrasi tinggi. Pada keadaan ini, molekul substrat berinteraksi dengan senyawa kompleks ES membentuk ESS yang bersifat tidak produktif, yang artinya tidak dapat mengurai dan menghasilkan produk.

### Harga Konstanta Michaelis-Menten ($K_M$)

Dari data hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktifitas enzim telah dibuat kurva antara 1/[substrat) dengan 1/aktivitas yang merupakan garis lurus. Dari grafik tersebut didapatkan harga $K_M$ dan $V_{mak}$ dari bakteri sel teramobil maupun dari bakteri sel bebas, terhadap substrat kasein. $K_M$ enzim protease dari bakteri sel teramobil adalah 0,220 dan $V_{max}$ adalah 6,290. Sedangkan $K_M$ dari enzim protease bakteri sel bebas adalah 0,166, $V_{max}$ adalah 5,687.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian tentang "Amobilisasi Sel dan Termoenzim Protease dari Bakteri Termofil Isolat Sumber Air Panas Rimbo Panti" dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Konsentrasi barium-alginat yang terbaik untuk mengamobilisasi Bakteri *Bacillus cereus* adalah 4 %
2. Enzim Protease dari bakteri sel teramobil maupun dari bakteri sel bebas, sama-sama mempunyai aktivitas 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.
3. Enzim protease yang bersumber dari bakteri teramobil lebih stabil terhadap penyimpangan pH dan suhu optimum.

## DAFTAR PUSTAKA

1. I. Chibata. Principles of immobilization Enzymes and Microbial Cells *in* T.W. Flecel & V. Meevcotisom. Immobilized Enzymes and Cells. Proceed. Regional Workshop Mahidol Univ. Bangkok, Thailand, p1-7, 1982.
2. I. Chibata. Tosa & Sato,. Methods of cell immobilization. *in* A.L. Demain & Solomon. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology vol. 53 p 218-223. (1985).
3. M.W.W Adams & R. M. Kelly. Enzymes from Microorganisms in Extreme Enviroments. Special Report (1995).

4. P.Lestari. Eksplorasi Enzim Termostabil dari Mikrob Termofil. Hayati, Vol 7, No 1. Hal: 21-25. (2000).
5. G. Calik, H.Savesci, P.Calik and T.H. Ozdamar. 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 (1999).
6. M. Ciani & L. Ferraro. Combine Use of Immobilized *Candida stella* cells and *Sacharomyces cerevisiae* to Improve the Quality of Wine. J. App. Microbiol. 85. Hal 247-254 (1998).
7. H. Dirnawan A. Suwanto, T. Purwadaria. Eksplorasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler dari Sumber Air Panas Gunung Pancar . Hayati Vol 7, No 2 . Hal: 52-55 (2000).
8. Fardiaz Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan, Penerbit IPB-Bogor (1989).
9. C.J. Gray, S.A. Barker, M.S. Dhariwal & J.M. Sullivan. Assay of the high-alkalin proteinase from alkalophilic *Bacillus* PB92 using chromogenic tripeptida substrat. Biotech. and Bioeng. vol XXXVII hal: 1717-1720 (1985).
10. A. L. Lehninger. Dasar-Dasar Biokimia. Thenawijaya. M. Jilid I hal. 235-250. Penerbit Erlangga, Jakarta (1993).
11. A.Mardoco, C. Kuek and R. Jenskin. Continuous Degradation of Phenol at Low Concentration Using Immobilized *Pseudomonas putida*. Enz. and Micro. Tech. Vol. 25. Hal 530-536 (1999).
12. M.G.Quintana. & H. Dalton. Biotransformasi of aromatic compounds by immobilized bacterial strain in barium-alginat. J. Enz. and Micro. Tech. 24: 232-236.(1999).
13. M.E. Stevanova ,A.I. Tonkova, E.P. Dobreva and D.I. Spasova. Agar Gel Immobilization of *Bacillus brevis* for Production of Thermostabil α-Amylase. Folia Microbiol 43 (1) .Hal. 42-46 (1998).
14. M.T. Suhartono. Enzim dan Bioteknologi, PAU Bioteknologi, IPB, Bogor. (1989).
15. M.T. Suhartono. Eksplorasi protease bakteri asal Indonesia. Laporan Penelitian. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor,(1996).
16. U.Sukandar, M. Wirahadikusumah . Amobilisasi sel *Escherichia coli* B 130 untuk produksi asam 6-aminopenisilat (6-APA) dari penisilin G. Dalam Seminar Nasional Bioteknologi Industri . Pusat Antar Universitas (PAU)-Bioteknologi. Institut Teknologi Bandung 1993.
17. E. Yusuf, E. Sukara dan R.R. Isnaniah. Immobilisasi sel Bakteri Amilolitik termopilik *Bacillus stearothermophilus* R1-A pada Kalsium alginat. Dalam pertemuan ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI), Bogor 2-3 Desember 1991 (1991).
18. J.G.Zeikus,C. Vielle & A. Savchenko. 1998.Thermozymes: Biotechnology and structure-function relationships. Dalam Extremophiles 2: 179-183. Springer-Verlag. Michigan (1998).