

EKSPLORASI BAKTERI-BAKTERI ISOLAT LOKAL PENGHASIL ENZIM SERIN-ALKALI PROTEASE

Yetria Rilda¹, Anthoni Agustien²

¹ Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Andalas

² Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas

INTISARI

Telah dilakukan penelitian mengenai eksplorasi bakteri lokal penghasil enzim serin-alkali protease. Bakteri diisolasi dari tanah Hutan Pendidikan dan Penelitian Universitas Andalas Padang dan air yang berasal dari sumber air panas Kili-kili Talang Kabupaten Solok. Skrining bakteri penghasil enzim serin-alkali protease dilakukan menurut metode Meinhardt, produksi enzim menurut Rahaman, aktivitas enzim ditentukan menurut metode Bergmeyer. Diperoleh 84 isolat berindikasi menghasilkan enzim protease dari 11 isolat bakteri (9 isolat bersifat mesofilik dan 2 isolat bersifat termofilik) dapat menghasilkan enzim protease dari golongan serin-alkali protease. Aktivitas enzim serin-alkali protease dari masing-masing isolat bakteri berkisar 0,02 – 0,23 unit/ml dengan isolat PSA-11 asal sumber air panas mempunyai aktivitas enzim yang tertinggi.

Kata kunci : eksplorasi, skrining, isolat, serin-alkali protease, aktivitas enzim

ABSTRACT

An exploration of local bacteria serine-alkali proteases producing has been carried out. The isolation bacterial from soil of school forest and water of Kili-kili Talang hot spring by total plate count method, screening of proteolysis bacteria by Meinhardt method while production and isolation proteases enzyme by Rahaman method. Activity proteases by Bergmeyer and Grassi method. Results showed that 84 isolates bacteria can be proteases enzyme producing, and include 11 isolates (9 mesophile and 2 termophile) could produced serine-alkali proteases. Serine-alkali proteases activity from isolates between 0.02 – 0.23 unit/ml. Bacteria PSA-11 hot spring isolated was also observed as a highly activity.

Key words : Exploration, screening, isolates, serine-alkali proteases, activity

PENDAHULUAN

Enzim protease bersifat proteolitik, yaitu enzim yang berfungsi mengkatalisis ikatan peptida pada protein. Enzim ini digolongkan ke dalam hidrolase C-N yakni mengkatalisis reaksi-reaksi pemecahan suatu substrat dengan bantuan molekul air¹. Enzim protease dapat digunakan dalam berbagai bidang industri detergen, kulit, makanan, penyamakan kulit dan farmasi². Secara komersial, enzim protease merupakan 60% dari hasil produksi industri enzim diseluruh dunia dengan nilai penjualan 400-600 juta USD³.

Mengingat betapa penting dan bernilai ekonomisnya enzim protease, maka sampai sekarang penelitian tentang enzim protease masih berlangsung, terutama mencari strain-strain baru bakteri dan mengisolasi enzim protease dari bakteri dari berbagai tempat. Isolasi bakteri *Microbacterium* dari air danau

yang bersifat alkali dan bakteri tersebut menghasilkan protease alkali. Isolasi "shipworm bacteria" yang menghasilkan protease alkali yang berfungsi sebagai zat adjuvan untuk pembersih dan isolasi enzim protease serin-alkali dari *Bacillus subtilis*, yang mempunyai daya hidrolisis protein sangat tinggi dan sangat baik sebagai komponen dari detergen^{4,5,6}.

Dalam industri detergen yang digunakan adalah enzim protease alkali yang dihasilkan oleh mikroba⁷. Mikroorganisme alkalifilik yang hidup pada suasana lingkungan alkali dapat menghasilkan enzim ekstraselular yang bersifat alkali⁸. Enzim protease berdasarkan mekanisme pemecahan substrat dibagi atas empat kelompok : serin protease, tiol protease, karboksil protease, dan metalo protease⁹. Serin protease merupakan kelompok protease yang mempunyai residu serin dan histidin pada lokasi aktifnya. Termasuk kedalam kelompok ini

adalah enzim endopeptidase seperti protease pemecahan pankreas, trypsin, kimotrypsin dan proteinase alkalin (basa) dari *Bacillus* dan *Aspergillus*. Subtilisin Carlsberg dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* merupakan enzim detergen dominan¹⁰.

Indonesia sebagai salah satu negara mega diversity di bumi sangat kaya akan aneka ragam spesies makhluk hidup. Pengetahuan mengenai kekayaan akan mikroorganisme yang indigenos Indonesia masih sedikit sekali¹¹. Daerah Sumatera Barat banyak memiliki tempat-tempat yang berpotensi sebagai sumber bakteri yang dapat menghasilkan enzim serin-alkali protease, seperti dari tanah Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi (HPPB) Universitas Andalas dan sumber air panas Kili-kili, Talang Kabupaten Solok, yang belum tercemar akan polusi.

Bertitik tolak hal yang di atas maka telah diteliti mengenai eksplorasi bakteri isolat lokal yang dapat menghasilkan enzim serin-alkali protease, yang mencakup tahap isolasi bakteri dari beberapa tempat di Sumatera Barat.

METODOLOGI

Pengambilan sampel

Kegiatan penelitian dilokasi adalah dengan mengambil masing-masing sebanyak 50 g sampel tanah 10 tempat di Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi Universitas Andalas dan Sumber air panas Kili-kili Talang, Kabupaten Solok. Pengambilan sampel air pada 10 titik dengan botol steril ukuran 100 ml.

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode Total Plate Count (TPC), suatu metoda standar untuk mengisolasi bakteri. Pada masing-masing sampel dilakukan pengenceran 10^{-4} . Selanjutnya dipipetkan 1 ml ke dalam cawan petri dan dituangkan 15 ml medium Nutrien Agar (NA). Diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar.

Skrining bakteri penghasil protease

Seleksi bakteri penghasil enzim protease dilakukan dengan modifikasi dari metoda Meinhardt¹². Masing-masing koloni bakteri pada medium NA diinokulasikan pada medium Skim Agar: 2%, pH 8, 0. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Jika terbentuk zona bening ("clear zone") disekitar koloni bakteri, hal ini memberikan indikasi bahwa bakteri tersebut menghasilkan enzim protease ekstraselular. Diukur zona bening pada masing-masing koloni bakteri. Selanjutnya strains-strains bakteri tersebut dibiakan pada

medium agar miring untuk stok. Selanjutnya untuk seleksi isolat yang dapat menghasilkan enzim serin-alkali protease, pada medium Skim Agar ditambahkan inhibitor PMSF, dan diinokulasikan isolat-isolat bakteri yang bersifat proteolitik yang diperoleh semula. Jika tidak terbentuk zona bening berarti isolat tersebut berindikasi menghasilkan enzim serin-alkali protease.

Produksi enzim protease

Untuk pertumbuhan sel bakteri dan menghasilkan enzim protease digunakan media fermentasi menurut formula Rahaman¹³: pati 2%, ekstrak khamir 0,5%, pepton 0,5%; Kalium fosfat 0,1%; Magnesium sulfat 0,02%; dan Natrium karbonat 1%. serta "trace element" dengan pH 8. Sebanyak 1% (v/v) inokulum masing-masing strain bakteri diinokulasikan pada erlenmeyer yang berisi 100 ml media produksi enzim protease. Inkubasi masing-masing pada suhu kamar selama 24 jam.

Isolasi enzim protease

Isolasi enzim dilakukan dengan cara mensentrifuga media produksi pada 4500 rpm selama 15 menit. Kemudian diambil supernatan yang merupakan larutan enzim kasar protease ekstraseluler. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim.

Uji aktivitas enzim

Analisis aktivitas enzim protease menggunakan metode Bergmeyer dan Grassl¹⁴. Disediakan 3 tabung reaksi, tabung reaksi I (sampel) tabung reaksi II (blanko) dan tabung III (standar). Kemudian pada masing-masing tabung reaksi dipipet 1 mL bufer borat pH 8; 3,20 mL kasein 2% dan 0,20 mL HCl 0,05 M. Selanjutnya pada tabung reaksi I ditambahkan 0,20 mL larutan ekstrak kasar enzim, pada tabung reaksi II ditambahkan 0,20 mL akuades dan pada tabung reaksi III ditambahkan 0,20 mL tirosin standar 5 mM. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL TCA 0,1 M pada masing-masing tabung. Dimasukkan 0,2 mL 2M CaCl₂ hanya pada tabung reaksi I. Sedangkan pada tabung reaksi II dan III dimasukkan 0,20 mL larutan enzim ekstrak kasar. Inkubasi kembali pada suhu 37° C selama 10 menit. Selanjutnya campuran reaksi dari masing-masing tabung reaksi disentrifuga pada 4000 rpm selama 10 menit 1,5 mL supernatan dipipet ke dalam masing-masing tabung reaksi I, II dan III yang baru. Dipipet masing-masing 5 mL Na₂CO₃ 0,4 M dan 1 mL Folin reagen 1 N ke dalam tabung tersebut. Inkubasi pada suhu 37 C selama 20 menit. Selanjutnya dibaca absorbansi pada panjang gelombang 579 nm.

Aktivitas enzim protease dapat diketahui dengan rumus:

$$\text{Aktivitas protease (Unit/mL)} = \frac{A_{sp} - A_{ob}}{A_{st} - A_{bi}} \times 1/T \times P$$

dimana A_{sp} adalah absorbansi sampel, A_{bi} adalah absorbansi blanko dan A_{st} adalah absorbansi standar, T adalah waktu inkubasi (menit) dan P merupakan faktor pengenceran¹⁴.

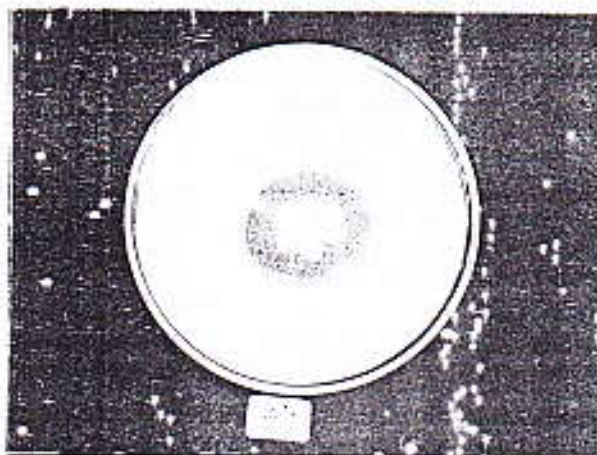
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Fisis dan Kimia Sumber air panas

Sumber air panas Kili-kili Talang, Kabupaten Solok mempunyai kondisi fisis dan kimia seperti berikut : pH air sekitar 5 sampai 6 ; suhu air 45 sampai 50 ° C, tidak bewarna, tidak berbau. Dengan kondisi tersebut dapat diprediksikan bahwa mikroorganisme yang hidup adalah kelompok bakteri termofilik.

Seleksi bakteri termofilik penghasil enzim protease

Dari berbagai sampel tanah Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi Universitas Andalas dan dari sumber air panas Kili-kili diperoleh 84 koloni bakteri yang dapat menghasilkan enzim protease atau bersifat proteolitik. Kemudian dilakukan seleksi isolat bakteri yang dapat menghasilkan enzim serin alkali protease dan diperoleh 11 koloni isolat bakteri yang tergolong pada enzim serin-alkali protease (9 koloni bakteri yang mesofilik dan 2 koloni bakteri termofilik). Isolat bakteri tersebut pada awal seleksi bakteri penghasil enzim protease mempunyai zona bening antara 0,4 sampai 2,4 cm disekitar koloni bakteri (Gambar 1).



Gambar 1. Diameter zona bening dari isolat bakteri penghasil enzim protease

Hal ini membuktikan bahwa bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim serin-alkali protease yang ekstraseluler. Sementara itu 73 isolat bakteri lainnya kemungkinan menghasilkan enzim thiol protease atau metallo-protease ataupun karboksil protease.

Tabel 1. Diameter zona bening dari bakteri asal HPPB dan sumber air panas Kili-kili

Kode isolat	Sumber isolat	Zona bening (cm)
PSA-1	Tanah	1,2
PSA-2	Tanah	0,6
PSA-3	Tanah	0,4
PSA-4	Tanah	1,6
PSA-5	Tanah	2,4
PSA-6	Tanah	0,8
PSA-7	Tanah	0,6
PSA-8	Tanah	0,9
PSA-9	Tanah	0,4
PSA-10	Air 45° C	2,0
PSA-11	Air 50° C	2,4

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa isolat-isolat bakteri proteolitik (PSA-1, PSA-2, PSA-3, PSA-4, PSA-5, PSA-6, PSA-7, PSA-8 dan PSA-9) yang berasal dari sampel tanah HPPB mempunyai zona bening 0,4 sampai 2,4 cm dan hanya satu koloni bakteri (isolat PSA-5) yang potensial menghasilkan enzim serin alkali protease, (zona bening PSA-5 lebih besar dari 2 cm). Isolat PSA-10 dan PSA-11 yang diisolasi dari sumber air panas Kili-kili mempunyai zona bening masing-masing 2,0 dan 2,4 cm yang berarti kedua isolat tersebut potensial untuk menghasilkan enzim serin-alkali protease. Adanya perbedaan zona bening dari masing isolat hal ini disebabkan aktivitas enzim dari masing-masing isolat yang disekresikan pada medium berbeda. Aktivitas enzim tersebut ditentukan oleh konsentrasi enzim, konformasi enzim, urutan asam amino pembentuk enzim dan macam asam amino pembentuk enzim.

Aktivitas enzim serin-alkali protease dari isolat bakteri

Aktivitas enzim serin alkali protease dari masing isolat bakteri asal tanah HPPB dan sumber air panas Kili-kili dapat dilihat pada Tabel 2. Dimana aktivitas enzim protease termostabil dari masing isolat bakteri berkisar antara 0,02 sampai dengan 0,23 unit/ml. Isolat bakteri PSA-11 asal sumber air panas Kili-kili mempunyai aktivitas tertinggi, sebesar 0,23 unit/ml. Adanya perbedaan aktivitas enzim serin-alkali dari masing masing isolat, hal ini disebabkan karena aktivitas enzim ditentukan oleh urutan dan jenis asam amino pembentuk protein enzim dan

konformasi enzim yang disintesis dalam sel masing-masing isolat bakteri. Adanya perbedaan aktivitas enzim dari masing-masing isolat bakteri tersebut dapat diprediksikan atau diduga bahwa isolat bakteri tersebut berbeda jenisnya.

Tabel 2. Aktivitas enzim serin-alkali protease dari masing masing isolat bakteri

Kode Isolat	Sumber isolat	Aktivitas enzim (Unit/ml)
PSA-1	Tanah	0,11
PSA-2	Tanah	0,05
PSA-3	Tanah	0,07
PSA-4	Tanah	0,03
PSA-5	Tanah	0,21
PSA-6	Tanah	0,04
PSA-7	Tanah	0,02
PSA-8	Tanah	0,09
PSA-9	Tanah	0,04
PSA-10	Air 45° C	0,10
PSA-11	Air 50° C	0,23

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Diperoleh 11 isolat bakteri yang dapat menghasilkan enzim serin-alkali protease
2. Aktivitas enzim serin-alkali protease tertinggi dihasilkan dari isolat PSA-11 sebesar 0,23 unit /ml

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Proyek Pengembangan Diri (PPD), Forum Heds-Project Tahun Anggaran 2003 yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. D. Aaslyng, Gorosene dan H. Malmos. Mechanistic studies of proteases and lipases for the detergent industry, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **50**, 321-330, (1991).

2. V. Ramamurthy dan R.M. Kothari. Comparison of fungal protease production by submerged and surface cultivation, *J. of Biotech*, **27**, 349-354, (1993).
3. O.P. Ward. "Proteolytic enzymes", *Comprehensive Biotechnology*, **3**, 789-815, (1985).
4. A. Gessesse dan B.A. Gashe. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake, *Biotechnol.-lett*, **19**, 479-481, (1997).
5. R.V. Greene, H.L. Griffin dan M.A. Cotta. Utility of alkaline protease from marine shipworm bacterium in industrial cleansing applications, *Biotechnol.-lett*, **18**, 759-764, (1996).
6. F.A.A. Mulder, D. Schipper, R. Bott. Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline *Bacillus subtilis*, *J. of Molecul.Biol.*, **292**, 111-123, (1999).
7. S.H. Moon dan S.J. Parulekar. A parametric study of protease production in batch and fed batch cultures of *Bacillus firmus*, *Biotech. Bioeng.*, **37**, 467-483, (1990).
8. T. Hamamoto dan K. Horikoshi. Alkaliphiles, *Encyclopedia of Microbiology*, **4**, 81-87, (1990).
9. W. Creuger dan A. Crueger. *Biotechnology, A Text book of Industrial Microbiology*, Science Tech., Madison, (1984).
10. M.T. Sunartono. Enzim dan bioteknologi, PAU Bioteknologi IPB, Bogor, (1999).
11. I. Gandjar dan A. Oetari. Mosaico, Makalah Utama pada Pertemuan Ilmiah Tahunan PERMI, Padang, (1999).
12. F. Meinhardt. Mikrobielle molekulbiologie, Institut fur Mikrobiologie, Univesity of Munster, Muenster, (1995).
13. R.S. Rahaman, J.Y. Chee, J.M.S. Cabral dan T.A. Hatton. Recovery of an extracellular alkaline protease from whole fermentation broth using reserved micelles, *Biotechnology progress*, **4**, 218-224, (1988).
14. H.U. Bergmeyer dan M. Grassi. Methods of enzymatic analysis, Verlag- Chemie International, Florida, (1983).