

Produksi dan Pengukuran Aktivitas Protease dari Isolat Bakteri BKL-1 dan BKU-31

(Production and Measurement of Protease Activity of BKL-1 and BKU-31 Bacteria Isolates)

Wiwit Artika

Dosen Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Unsyiah Darussalam Banda Aceh

E-mail: artikaw@gmail.com

Abstract

BKL-1 and BKU-31 bacteria isolates were collected from digestive tract of kerapu lumpur (*Epinephelus tauvina*) and identified as *Serratia marcescens biogp 1* dan *Serratia marcescens* respectively. BKL-1 crude protease were obtained after 27 hours incubation period in Nutrient Broth (NB) medium added with peptone 0.5%, NaCl 0.5%, lactose 0.1%, and CaCl₂ 0.1%. BKU-31 crude proteases were obtained in NB medium added with 0.1% skimmed milk (NBS) for 18 hours incubation period. The highest activity of proteases of *S. marcescens biogp 1* BKL-1 reached after 27 hours of incubation, namely 0.002 U/ml with protein concentration 0.064 mg/ml. The proteases of *S. marcescens* BKU-31, on the other hand, reached their highest activity (0.064 U/ml) at 24 hours of incubation with protein concentration 0.056 mg/ml. The optimum temperature crude BKL-1 proteases were 30°C, whereas BKU-31 proteases had the optimum temperature of 50 °C.

Key Words: *Production, Protease Activity, Serratia marcescens*

PENDAHULUAN

Enzim proteolitik semula dikenal karena kaitannya dengan proses pencernaan. Di dalam tubuh ikan, bakteri penghasil enzim proteolitik umumnya hidup di dalam jaringan ikan termasuk saluran pencernaan. *Citrobacter* sp. (Ariana 2003), *Bacillus* sp. (Fitri 2003; Sukma 2003) merupakan bakteri yang diketahui terdapat pada saluran pencernaan ikan.

Enzim proteolitik (protease) banyak diaplikasikan dalam industri pangan maupun nonpangan. Dalam industri pangan, protease digunakan antara lain untuk menjernihkan bir, mengempukkan daging, memperbaiki tekstur adonan roti dan lain-lain (Rao *et al* 1998; Suhartono 1992). Sedangkan pada industri nonpangan digunakan untuk meningkatkan fungsi detergen dalam membersihkan noda, membantu penyamakan kulit (Crueger & Crueger 1984) dan di bidang farmasi, misalnya kolagenase atau subtilisin digunakan untuk perawatan luka bakar dan protease alkalin yang menggantikan tripsin asal hewan (Rao *et al.* 1998).

Protease (proteinase dan peptidase) termasuk ke dalam kelompok enzim hidrolase karena dalam reaksinya melibatkan air pada ikatan substrat spesifik. Berdasarkan mekanisme kerjanya, protease dibedakan atas: (a) protease serina yang memiliki residu serina pada sisi aktifnya dan dihambat oleh

diisopropilfluorofosfat (DFP) dan fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF); (b) protease sisteina yang memiliki gugus tiol (-SH) pada sisi aktifnya dan hanya akan aktif jika ada senyawa pereduksi seperti HCN atau sisteina; (c) metaloprotease yang aktivitasnya tergantung dari kation divalen dan dihambat oleh senyawa pengkelat etilendiaminatetraasetat (EDTA); (d) protease asam aspartat yang memiliki residu asam aspartat pada sisi aktifnya dan dihambat oleh diazoasetil-DL-norleusin metil ester (DAN) (Rao *et al.* 1998).

Protease dapat dihasilkan dari hewan (tripsin, pepsin), tumbuhan (papain, bromelin), dan mikroba. Protease asal mikroba antara lain *Serratia marcescens* NRRL B-23112 asal tanah (Salamone & Wodzinski 1997) *Bacillus* sp. dari kulit ikan kakap (Rosdiana *et al.* 2002), dan *Photorhabdus* sp. asal nematoda azorean (Cabral *et al.* 2004).

Serratiopeptidase juga dikenal sebagai serratiopeptidase, serrapeptidase, atau serrapeptase merupakan enzim peptidase yang diisolasi dari *Serratia* sp. HY-6 (Lane 2004) dan nonpatogen *enterobacteria Serratia* E-15 (Rao *et al.* 1998) asal saluran usus ulat sutera Jepang.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan produksi dan uji aktivitas protease ekstraseluler dari isolat bakteri BKL-1 dan BKU-31 asal saluran pencernaan ikan kerapu

lumpur, serta mengidentifikasi isolat BKL-1 dan BKU-31.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini berasal dari saluran pencernaan ikan kerapu lumpur bagian lambung untuk BKL-1 (Ariana 2003) dan bagian usus untuk BKU-31 (Fitri 2003). Isolat bakteri BKL-1 dan BKU-31 yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA, IPB.

Peremajaan Isolat

Biakan murni disimpan dan diremajakan pada media agar nutrien. Sebanyak satu sengkeli koloni digores dengan metode kuadran pada media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung susu skim 1% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Ciri-ciri Morfologi dan Fisiologi Bakteri

Ciri-ciri Morfologi bakteri diamati secara konvensional melalui pengamatan mikroskopik (bentuk sel dan pewarnaan gram). Pengujian fisiologi (biokimia) dilakukan dengan menggunakan *Microbact* (Microgen, Australia). Sebanyak 2-3 sengkeli biakan berumur 24 jam dipindahkan ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0.85%) kemudian dimasukkan ke dalam sumur *Microbact* dan diinkubasi selama 24 jam.

Penyiapan Inokulum dan Penentuan Kurva Turbiditas Pertumbuhan

Sebanyak 2-3 sengkeli isolat bakteri BKU-31 yang berumur 24 jam ditumbuhkan dalam 20 ml media cair *Nutrient Broth* (NB) ditambah dengan 0.1% susu skim (Anlene, New Zealand) disebut media NBS. Sedangkan sebanyak 2-3 sengkeli isolat bakteri BKL-1 berumur 24 jam ditumbuhkan dalam 20 ml media cair NB modifikasi dengan komposisi NB + pepton 0.5%, NaCl 0.5%, laktosa 0.1%, dan CaCl₂ 0.1%. Kedua biakan dikocok dengan kecepatan 140 rpm selama periode waktu masing-masing isolat, yaitu sampai jumlah sel mencapai $\pm 1 \times 10^8$ sel/ml atau OD=0.341 pada isolat BKL-1 dan OD=0.390 pada isolat BKU-31 pada suhu ruang. Biakan yang ditumbuhkan dalam kedua media ini disebut inokulum.

Kemudian sebanyak 10% inokulum dimasukkan ke dalam 200 ml media produksi protease yang memiliki komposisi sama seperti media inokulum. Kurva turbiditas

pertumbuhan sel diperoleh dengan mengukur nilai OD setiap 3 jam selama 24-30 jam pada panjang gelombang 620 nm. Selama selang waktu tersebut sebanyak 5-6 ml dari media produksi disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit sehingga diperoleh protease ekstrak kasar. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas protease.

Pengukuran Aktivitas Protease dan Kadar Protein

Aktivitas protease ditentukan dengan metode Walter (1984) yang dimodifikasi. Kasein 1% digunakan sebagai substrat enzim. Reaksi antara substrat dengan enzim berlangsung 10 menit pada suhu 37 °C. Reaksi dihentikan dengan penambahan asam trikloroasetat (TCA) 10%. Ke dalam supernatan ditambahkan Na₂CO₃ 0.5 M dan pereaksi Follin Ciocalteau (1:2). Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 μ mol tirosina per menit pada suhu dan pH optimum.

Kadar protein diukur dengan metode Bradford *microassay* (Bradford 1976). Sebanyak 0.4 ml sampel enzim ditambahkan ke dalam 4 ml pereaksi Bradford, dikocok kuat dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang lalu diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar dibuat dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) dengan kisaran konsentrasi 0.01-0.1 mg/ml protein.

Aktivitas spesifik protease (U/mg) merupakan nisbah antara aktivitas protease (U/ml) dengan kadar protein (mg/ml).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi biakan

Hasil pengamatan ciri-ciri morfologi dari isolat BKL-1 yaitu anaerob fakultatif, gram negatif, dan berbentuk batang pendek, sedangkan isolat BKU-31 memiliki ciri-ciri morfologi anaerob fakultatif, gram negatif, dan berbentuk batang pendek.

Berdasarkan hasil pengujian dengan kit *Microbact* (Tabel 1), isolat BKL-1 diidentifikasi sebagai *Serratia marcescens biogp 1* dengan tingkat kebenaran 100% (*percent probability*). Sedangkan isolat BKU-31 diidentifikasi sebagai *Serratia marcescens* dengan tingkat kebenaran 97.16%.

Penyiapan Inokulum dan Penentuan Kurva Turbiditas Pertumbuhan

Pertumbuhan *Serratia marcescens* biogp 1 BKL-1 pada media modifikasi (NB + pepton 0.5%, NaCl 0.5%, laktosa 0.1%, dan CaCl₂ 0.1%) selama selang waktu inkubasi 30 jam menunjukkan peningkatan nilai rapat optis hingga jam ke-9, selanjutnya relatif stabil sampai jam ke-30. Kurva turbiditas pertumbuhan *S. marcescens* BKU-31 pada media NBS selama selang waktu 24 jam, menunjukkan peningkatan nilai rapat optis yang terjadi pada jam ke-3 sampai jam ke-18 kemudian menurun pada jam ke-21 dan meningkat kembali pada jam ke-24. Pada pengukuran turbiditas kedua isolat, inokulum sel diperoleh pada saat sel berada dalam fase eksponensial (Gambar 1).

Tabel 1 Ciri-ciri morfologi dan fisiologi isolat BKL-1 dan BKU-31 berumur 24 jam dan *Serratia marcescens*

Ciri-ciri	BKL-1	BKU-31	* <i>Serratia marcescens</i>
Bentuk sel	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
Pewarnaan gram	Negatif	Negatif	Negatif
Oksidase	-	-	-
Nitrat	+	+	+
Lysin	-	+	+
Ornitrin	-	+	+
H ₂ S	-	-	-
Glukosa	+	+	+
Manitol	+	+	+
Xilosa	-	+	-
ONPG (O-Nitrophenyl-B-d-Nitrophenyl-B-de)	-	+	+
Galaktopyranoside)	-	-	-
Indol	-	-	-
Urease	+	-	[-]
Voges	-	+	+
Proskauer	-	+	+
Sitrat	-	+	+
TDA	-	-	-
(Tryptophan Deaminase)	-	-	-
Gelatin	+	+	+
Malonat	-	-	-
Inositol	+	-	[+]
Sorbitol	+	+	+
Rhamnosa	-	-	-
Sukrosa	+	+	+
Laktosa	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Adonitol	-	+	d
Rafinosa	-	-	-
Salisin	+	+	+
Arginin	+	+	-

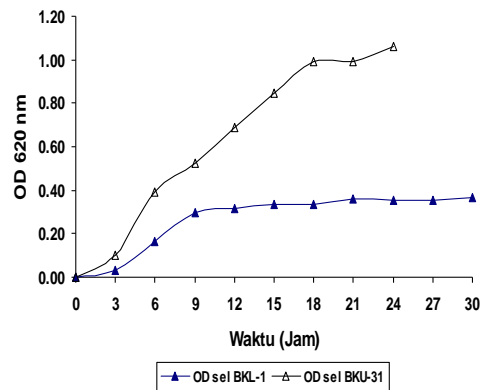
* Holt *et al.* (1994),

[-] = 11-25% positif, [+] = 76-89% positif, d = 11-89% galur positif

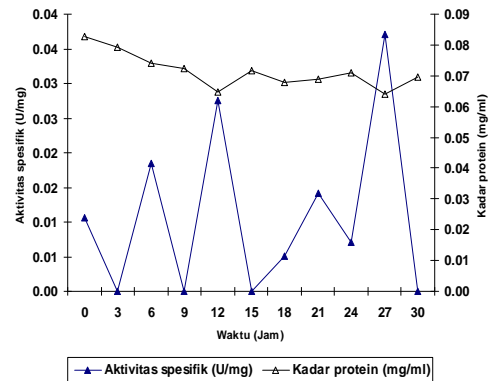
Pengukuran Aktivitas Protease dan Kadar Protein

Aktivitas protease *S. marcescens* biogp 1 BKL-1 yang ditumbuhkan pada media NB modifikasi membentuk empat puncak, yaitu pada umur 6, 12, 21, dan 27 jam. Aktivitas unit protease tertinggi dicapai pada saat biakan berumur 27 jam, yaitu sebesar 0.002 U/ml dengan kadar protein 0.064 mg/ml. Aktivitas spesifik protease tertinggi yang dicapai pada saat umur biakan 27 jam sebesar 0.04 U/mg (Gambar 2).

Sedangkan *S. marcescens* BKU-31 yang ditumbuhkan pada media NBS memiliki aktivitas protease tertinggi pada jam ke-18 dan jam ke-24 masing-masing sebesar 0.056 U/ml dan 0.064 U/ml. Kadar protein dan aktivitas spesifik pada jam ke-18 yaitu 0.048 mg/ml dan 1.172 U/mg, sedangkan pada jam ke-24 sebesar 0.056 mg/ml dan 1.175 U/mg (Gambar 3).

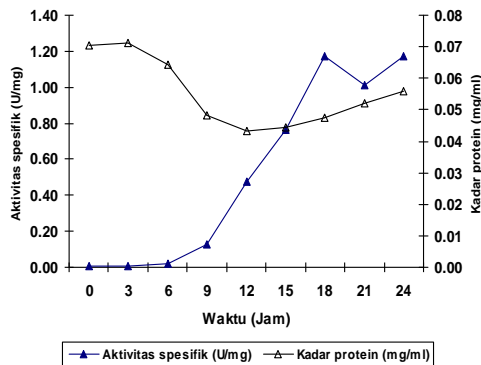


Gambar 1. Kurva turbiditas *S. marcescens* biogp 1 BKL-1 di dalam media NB modifikasi selama 30 jam dan *S. marcescens* BKU-31 di dalam media NBS pada pH 8.0, suhu 37 °C.



Gambar 2. Kurva aktivitas spesifik dan kadar protein protease *S. marcescens*

biogp 1 BKL-1 yang ditumbuhkan dalam media NB modifikasi pada pH 8,0, suhu 37 °C.



Gambar 3. Kurva aktivitas spesifik dan kadar protein protease *S. marcescens* BKU-31 yang ditumbuhkan dalam media NBS pada pH 8,0, suhu 37 °C.

Pembahasan

Sistem *Microbact* Gram Negatif merupakan produk dari Oxoid yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri aerob dan aerob fakultatif gram negatif (enterobakteria dan bakteri gram negatif miselia). *Microbact* menggunakan sistem mikro-substrat yang didesain berdasarkan simulasi konvensional substrat biokimia dalam mengidentifikasi enterobakteria dan bakteri gram negatif miselia (MGNB). Identifikasi organisme didasarkan pada perubahan pH dan penggunaan substrat (Oxoid 2004).

Bakteri gram negatif yang termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae* diketahui mampu mensekresikan sejumlah besar protease ekstraseluler ke media sekitarnya. *Serratia* sp. galur E-15 memiliki potensi yang tinggi dalam memproduksi metaloprotease ekstraseluler (Rao *et al.* 1998). *Serratia* sp. asal usus ulat sutera Jepang tergolong ke dalam *enterobacteria* nonpatogen. Supriyadi *et al.* (2003) melaporkan bahwa *Serratia marcescens* dan *Serratia* sp. yang diisolasi dari ginjal ikan patin dan mendominasi sampel ikan patin asal Jambi bersifat nonpatogen. Sehingga diperkirakan bahwa *S. marcescens biogp 1* BKL-1 dan *S. marcescens* BKU-31 tergolong ke dalam bakteri nonpatogen.

Produksi enzim protease *S. marcescens biogp 1* BKL-1 dilakukan ketika biakan berumur 27 jam yang diperkirakan berada pada fase stasioner. Produksi protease *Bacillus pumilus* Y1 meningkat saat mencapai

fase stasioner dan mendekati kematian, dengan aktivitas optimum dicapai pada 20-25 jam masa inkubasi (Suhartono 1996). Sintesis protease ekstraseluler biasanya terjadi pada fase diam (stasioner), hal ini terkait dengan mekanisme represi katabolit. Selama fase pertumbuhan eksponensial, sel akan mengalami hambatan represi katabolit, sehingga menurunkan konsentrasi cAMP intraseluler yang dapat mengaktifkan transkripsi mRNA penyandi protease. Memasuki fase stasioner, represi katabolit mulai menurun sehingga mengaktifkan biosintesis enzim (Suhartono 1992). Pola aktivitas protease yang fluktuatif juga dilaporkan dalam penelitian Mubarik & Wirahadikusumah (1996). Kadar protein ekstrak kasar *S. marcescens biogp 1* BKL-1 menunjukkan nilai yang hampir sama pada setiap 3 jam masa inkubasi.

Berdasarkan kurva tumbuh *S. marcescens* BKU-31 bahwa produksi enzim optimum terjadi pada saat sel berada dalam fase eksponensial atau biakan berumur 18 jam. Pada genus *Bacillus*, sintesis enzim ekstraseluler dalam jumlah terbesar secara normal terjadi pada saat sebelum sporulasi, yaitu pada akhir fase eksponensial atau awal stasioner (Suhartono 1992). Chantawannakul *et al.* (2002) melaporkan bahwa *B. subtilis* galur 38 semua sel bakteri muncul dalam bentuk sel vegetatif selama 12 jam pertama, kemudian terbentuk spora antara 16 dan 24 jam periode inkubasi. Hasil ini mengindikasikan bahwa produksi tertinggi protease dicapai selama fase eksponensial dan berlangsung konstan saat spora telah terbentuk (fase stasioner). Produksi protease pada akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner telah dilaporkan oleh Mubarik & Wirahadikusumah (1996). Kadar protein ekstrak kasar *S. marcescens* BKU-31 menunjukkan nilai yang menurun sampai jam ke-16 dan sedikit meningkat saat memasuki jam ke-18.

SIMPULAN

Isolat BKL-1 dan BKU-31 masing-masing diidentifikasi sebagai *Serratia marcescens biogp 1* dan *Serratia marcescens*. Aktivitas protease *S. marcescens biogp 1* BKL-1 tertinggi dicapai pada saat biakan berumur 27 jam, yaitu sebesar 0.002 U/ml dengan kadar protein 0.064 mg/ml. Sedangkan *S. marcescens* BKU-31 memiliki aktivitas protease tertinggi pada jam ke-24 yaitu 0.064 U/ml dan Kadar protein pada jam ke-24 sebesar 0.056 mg/ml. Ekstrak kasar protease

Serratia marcescens biogp 1 BKL-1 memiliki suhu optimum 30°C, sedangkan *S. marcescens* BKU-31 mempunyai aktivitas optimum pada suhu 50 °C.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariana. 2003. Produksi dan karakterisasi protease *Citrobacter* sp. galur BKL-1 dari saluran pencernaan ikan kerapu lumpur (*Epinephelus tauvina*) [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive methode for quantitation of microgram quantities of protein in utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Cabral CM, Cherqui A, Pereira A, Simoes N. 2004. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. *Appl Environ Microbiol* 70:3831-3838.
- Chantawannakul P, Onchalee A, Klanbut K, Chukeatirote E, Lumyong S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 galured from traditionally fermented soybean in Nothern Thailand. *Science Asia* 28:241-245.
- Crueger W, Crueger A. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Madison: Science Tech Inc.
- Fitri SGS. 2003. Karakterisasi dan produksi protease ekstraseluler *Bacillus* sp. galur BKU-10 dari saluran *Epinephelus tauvina* [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Lane J. 2004. Serratiopeptidase [technical bulletin]. <http://www.sedonlabs.com/PDF/TBserratiopeptidase.pdf> [6 Januari 2005].
- Mubarik NR, Wirahadikusumah M. 1996. Pemurnian dan karakterisasi protease ekstraseluler *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Hayati* 3:50-54.
- Oxoid. 2004. Gram negative identification system. [http://www.oxoid.com/uk/index.asp?mpage=productdetail&pre\[24 Januari 2005\]](http://www.oxoid.com/uk/index.asp?mpage=productdetail&pre[24 Januari 2005]).
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Review* 62:597-635.
- Roosdiana A, Kartikaningsih H, Suharjo, Perangiangan R, Murdinah. 2002. Isolasi dan karakterisasi *Bacillus* sp. penghasil protease dari kulit ikan kakap merah (*Lutjanus sanguineus*). *J Ilmu-ilmu Hayati* 14:202-210.
- Salamone PR, Wodzinski RJ. 1997. Production, purification and characterization of a 50-kDa extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:317-324.
- Suhartono MT. 1992. *Protease*. Bogor: Depdikbud, DIKTI, PAU IPB.
- Suhartono MT, Satiawihardja B, Widjaja IPN. 1996. Characterization of protease enzyme produced from *Bacillus pumilus* Y1 galured from liquid tofu waste. *J Mol Biol Biotech* 2:193-199.
- Sukma P. 2003. Produksi dan karakterisasi protease *Bacillus* sp. galur BBU-32 asal saluran pencernaan *Parastromateus niger* [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Supriyadi H, Taukhid, Effendi J. 2003. Identifikasi jasad penyebab pada benih ikan patin jambal (*Pangasius djambal*) serta cara penanggulangannya. *J Pen Per Indones* 9:37-41.
- Walter H-E. 1984. *Proteinases (Protein as Substrates)*. Di dalam Bergmeyer J, Gra I M, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed ke-3. Weinheim: Verlag Chemic. hlm 270-278.