

THE UTILIZATION OF THERMOPHILIC PROTEASE WHICH LIFE IN HOT SPRING CANGAR BATU MALANG

Pemanfaatan Protease Termofil yang Hidup di Sumber Air Panas Cangar Batu Malang

Rudiana Agustini*

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
State University of Surabaya, Surabaya, Indonesia

Received 1 March 2006; Accepted 30 March 2006

ABSTRACT

*Thermophile protease has economic value, because this enzyme is useful on all kind of industry that used high temperature on it production process. The thermophile has been isolated from hot water spring at Cangar Batu Malang called CG-10 isolate. The characteristic of CG-10 are; bolt colony has a brown-white colour, rod form cels with size 6-14 μm and Gram positive. Identification with 16S-rRNA gene of their isolate shows 98.305% similarity with *B. caldoolyolyticus*. The protease characteristic of CG-10 isolate, fractionated by ammonium sulfate 35% (w/v), centrifuged by 4000 rpm of speed for 15 minute, (1) has optimum temperature of 80°C; (2) has optimum pH 8, (3) can survive until 60 minutes of incubation time at temperature 80°C, (4) the molecule weight of: 60-76 kDa with pH_1 value between 7.5 – 8.20, (5) this protease is alkaline serine protease, and (6) V_{maks} value 0.622 unit menit^{-1} and K_M 9.8 $\mu\text{mol/L}$, so this CG-10 isolate protease can be use in detergent industry.*

Keywords: Protease, Thermophile.

PENDAHULUAN

Protease termasuk enzim proteolitik, yaitu enzim yang dapat menguraikan atau memecah protein dan mempunyai nilai ekonomis karena dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri. Enzim yang dimanfaatkan di industri antara lain: proteolitik atau protease (kurang lebih 59%) dan karbohidrase (28%). Protease yang digunakan dalam industri sebagian besar diperoleh dari sumber sel mikroorganisme, sebagai contoh: *B. licheniformis* dan *B. subtilis* (digunakan untuk detergen pada industri kulit dan pembuatan keju), *Aspergillus niger* (industri keju, daging, sereal, buah, minuman dan roti), *Aspergillus melleus* (koagulasi susu pada pembuatan keju), *B. subtilis*, *B. cereus* (produksi minuman dan roti), *B. subtilis* (industri detergen). Seluruh mikroorganisme yang ada, baru 2% yang telah diteliti sebagai sumber enzim [1]. Protease mikroorganisme lebih menguntungkan dari pada protease yang diisolasi dari tanaman maupun hewan. Hal ini dikarenakan faktor-faktor variasi aktivitas katalitik tersedia besar, prosedur produksi lebih aman, manipulasi genetik dan lingkungan dapat dilakukan untuk menambah jumlah sel yang dihasilkan, menambah aktivitas enzim yang dihasilkan dengan jalan induksi, waktu pertumbuhan pendek, membutuhkan nutrisi yang relatif sederhana, dan prosedur pemisahan yang relatif sangat sederhana.

Mikroorganisme yang ada di alam ini beraneka ragam dan dapat dikelompokkan menjadi beraneka ragam pula, hal ini tergantung dari dasar yang

dipergunakan untuk mengelompokannya. Berdasarkan kondisi fisik yaitu rentang temperatur yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya, mikroorganisme dibedakan menjadi psikrofil, mesofil, termofil dan hipertermofilik [2]. Termofil dan hipertermofil tergolong mikroorganisme yang tumbuh di lingkungan ekstrem. Mikroorganisme ini dapat ditemukan di sumber air panas dan kawah geotermal yang ada di beberapa tempat di dunia [3]. Mikroorganisme yang hidup di wilayah dengan temperatur di atas 70 °C ini hanyalah prokariot yaitu bakteri dan archaea [4]. Tidak ada mikroorganisme eukariotik yang toleran pada temperatur > 60 °C. Banyak peneliti yang tertarik untuk melihat bagaimana struktur molekul mempengaruhi aktivitas mikroorganisme sehingga dapat tumbuh pada kondisi yang ekstrem tersebut. Salah satu penyebab adalah adanya ikatan kimia yang memelihara integritas DNA dan molekul-molekul esensial lainnya [5]. Ekstremozim beberapa mikroorganisme yang menyukai temperatur tinggi mengandung ikatan ionik dan kekuatan eksternal lainnya yang membantu menstabilkan struktur enzim. Madigan dan Marrs menyatakan bahwa terdapat kurang lebih 20 kelompok penelitian di U.S, Jepang, Jerman, saat ini aktif mencari mikroorganisme yang hidup di lingkungan ekstrem termasuk termofilik [5]. Hanya sedikit enzim yang berhasil diperoleh, hal ini dikarenakan kesulitan dalam mengkondisikan mikroorganisme tersebut di laboratorium sebagaimana mikroorganisme ini hidup dalam lingkungan alamnya.

* Email address : rudianaagustini@yahoo.com

Di Indonesia banyak ditemukan lingkungan ekstrem, misalnya: kawah gunung berapi dan sumber air panas. Ada beberapa sumber air panas yang terdapat di Jawa, misalnya: sumber air panas Gunung Pancar, Cimanggu, dan Cangar. Penelitian yang telah dilakukan adalah isolasi dan karakterisasi mikroorganisme dari Gunung Pancar dan Cimanggu [6,7]. Mikroorganisme yang ada di sumber air panas Cangar belum banyak diteliti, terutama pemanfaatan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang mikroorganisme yang tumbuh di lingkungan tersebut dan enzim-enzim yang diproduksi.

Beberapa protease yang digunakan untuk industri stabil pada temperatur tinggi, dikenal dengan protease termostabil. Govordhan dan Margolin menyatakan bahwa protease termostabil dapat diisolasi dari mikroorganisme termofilik ataupun hipertermofilik [8]. Studi memperlihatkan bahwa stabilitas protease dari termofilik memberikan korelasi yang baik antara temperatur dari sumber mikroorganisme tersebut dengan stabilitas protease ekstraseluler yang diproduksi.

Seperti sifat enzim pada umumnya, aktivitas katalitik protease dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya: pH, temperatur, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor. Protease dari jenis mikroorganisme yang sama dapat mempunyai karakter atau sifat berbeda, hal ini tergantung dari kondisi perlakuan. Demikian pula jenis protease sama tetapi dari mikroorganisme berbeda dapat memperlihatkan karakter yang berbeda.

Dalam rangka pemanfaatan protease termofilik yang hidup di sumber air panas Cangar Batu Malang dilakukan suatu penelitian tahap awal yang bertujuan untuk : isolasi mikroorganisme dari sumber air panas Cangar yang mampu menghasilkan protease, mempelajari ciri morfologi, fisiologi dan gen 16S-rRNA mikroorganisme penghasil protease hasil isolasi, dan mempelajari karakter protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang hidup di sumber air panas Cangar, meliputi karakter pH optimum, stabilitas thermal, temperatur optimum dan jenis enzim.

METODE PENELITIAN

Untuk mencapai tujuan dilakukan suatu penelitian dengan langkah-langkah sebagai berikut: isolasi, identifikasi morfologi, fisiologi dan gen 16S-rRNA mikroorganisme penghasil protease yang hidup di sumber air panas Cangar, preparasi/isolasi protease mikroorganisme termofil, dan karakterisasi protease yang meliputi penentuan pH dan temperatur optimum, berat molekul, pH isoelektrik, jenis protease.

Isolasi mikroorganisme dari sumber air panas Cangar dilakukan dengan cara sebagai berikut: menumbuhkan mikroorganisme yang telah diambil dari sumber air panas Cangar pada media yang sesuai yaitu *skim milk agar* (SMA) dengan kondisi temperatur 70 °C. Koloni yang dihasilkan kemudian ditentukan aktivitas

proteolitiknya berdasarkan diameter zona bening yang menunjukkan indeks proteolitik dari masing-masing koloni. Isolat yang menunjukkan indeks proteolitik besar selanjutnya ditumbuhkan dalam berbagai medium dengan tujuan untuk mencari medium yang cocok bagi isolat. Medium yang dipergunakan adalah medium LB (*yeast extract* 1%, NaCl 1 %, tripton 0.5 % dan skim 2 %), medium *Thermus* (MgSO₄.7H₂O 0,1 %, K₂HPO₄ 0,1 %, (NH₄)₂SO₄ 0,7 %, NaCl 0,1 %, skim 2 %) dan medium limbah cair tahu. Kultur kemudian diinkubasi pada temperatur 70 °C selama 16 jam, selanjutnya dilakukan uji aktivitas proteolitik. Isolat yang menghasilkan aktivitas tertinggi pada salah satu medium merupakan medium yang cocok bagi isolat tersebut dan medium tersebut digunakan sebagai medium produksi.

Pada preparasi protease, mikroorganisme dikultivasi dalam *shaker waterbath* dengan temperatur 65 °C, selanjutnya setelah 18 jam dipanen dan dilakukan pemisahan biomasa sel dengan sentrifus dingin merk Mistral 6000, kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya protease diisolasi. Untuk isolasi protease digunakan garam ammonium sulfat dengan konsentrasi 35 % (w/v). Pemisahan dilakukan dengan menggunakan sentrifuse dingin merk "Mistral 6000", kecepatan 4000 rpm selama 15 menit Endapan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar protease, selanjutnya dilakukan karakterisasi.

Penentuan temperatur optimum dilakukan dengan cara mereaksikan enzim dengan substrat dalam buffer pH 8, selanjutnya diinkubasi pada temperatur yang bervariasi, yaitu kamar (30 °C), 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C dan 90 °C selama 10 menit dan dilakukan pengukuran aktivitas. Untuk pengukuran aktivitas menggunakan metode Walter [9]. Pada metode ini setelah substrat direaksikan dengan enzim selama 10 menit, reaksi dihentikan dengan menambahkan TCA. Produk ditentukan dengan menggunakan pereaksi fenol (Folin) dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (Novaspec) pada panjang gelombang 578 nm.

Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara mereaksikan enzim dengan substrat (kasein) dalam buffer yang memiliki pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 selanjutnya diinkubasi dalam pada temperatur optimum dan dilakukan pengukuran aktivitas (Metode Walter).

Penentuan stabilitas termal dilakukan dengan cara melarutkan enzim dalam buffer pH optimum, larutan diinkubasi pada temperatur optimum. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas dalam selang waktu 10 menit sampai enzim tidak memperlihatkan aktivitas sama sekali.

Penentuan berat molekul protease dengan SDS-PAGE dan zimogram dengan langkah sebagai berikut: membuat gel pemisah (SDS maupun zimogram: 8 % poliakrilamid) dan gel penahan (4 % poliakrilamid). Memasukkan gel ke rangkaian alat elektroforesis

dengan buffer komposisi: glisin 192 mM, SDS 0,1%, Tris base 24,8 mM dimasukkan dan alat elektroforesis dirangkai. Sebelum dimasukkan ke dalam sumur, marker dan sampel diinkubasi dalam penangas air mendidih selama 1 menit. Untuk zimogram tidak perlu diinkubasi karena enzim akan rusak. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 1/4 jam, hingga *bromphenol blue* mencapai 1 cm di bawah gel. Untuk deteksi SDS-PAGE, gel elektroforesis dilepas dari cetakan dan diukur jarak migrasi *bromphenol blue*. Selanjutnya gel tersebut dicelup dalam larutan pewarna (50% metanol + 10% asam asetat + 0,06% coomassie blue R-250) selama 30 menit sambil digoyang konstan. Kelebihan warna dibuang dengan merendam gel dalam larutan peluntur (5% metanol + 7,5% asam asetat) sampai diperoleh pita-pita protein yang berwarna biru dengan latar belakang jernih. Untuk deteksi zimogram: setelah elektroforesis, gel dilepas dari cetakan dan direndam dalam larutan renaturasi (TritonX-100 2,5%) selama 1 jam sambil digoyang konstan. Selanjutnya gel ditiriskan dan direndam dalam buffer dengan pH optimum enzim yang diuji dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur optimum enzim. Kemudian gel diwarnai dengan pewarna *coomassie blue* R-250. Daerah bening (*clear zone*) menunjukkan hidrolisis kasein dengan latar belakang biru. Pita sampel yang terbentuk dibanding pita marker yang telah diketahui berat molekulnya.

Penentuan pH_i dengan IEF/ elektroforesis 2-dimensi [10]. Komposisi gel sama dengan komposisi untuk zimogram. Penentuan jenis protease dilakukan dengan zimogram. Prosedur sama dengan pembuatan zimogram pada penentuan berat molekul. Adapun perbedaannya adalah enzim sebelum dimasukkan ke dalam sumur ditambah dengan senyawa PMSF, klorida divalen, dan EDTA. Selanjutnya dilihat sampel mana yang masih memperlihatkan aktivitas proteolitik (*clear zone*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Mikroorganisme dari Sumber air panas Cagar

Pada penapisan dan pemurnian mikroorganisme termofil penghasil protease yang hidup di Cagar Jawa Timur dalam penelitian pendahuluan ini diperoleh 24 isolat (diberi nama CG-1 sampai dengan CG-24). Isolat CG-10 mempunyai indeks proteolitik besar, dengan ciri-ciri: koloni berwarna putih kecoklat-coklatan, selnya berbentuk batang, ukuran sel 6-14 μm , motil, aerob, termofil obligat, dan bersifat Gram positif. Isolat ini ternyata memiliki kelebihan bila dibandingkan dengan isolat-isolat lain, karena dapat tumbuh baik di laboratorium yaitu pada medium SMA (*Skim Milk Agar*) sampai temperatur 76 °C. Temperatur ini jauh di atas temperatur lingkungan alami organisme ini hidup, yaitu 50 °C. Pada medium cair isolat ini tumbuh optimum

(ditinjau dari segi produktivitasnya dalam menghasilkan protease) pada temperatur 65 °C. Bila dibandingkan dengan isolat-isolat yang berasal dari sumber air panas lain isolat CG-10 dapat tumbuh di laboratorium pada temperatur lebih tinggi. Isolat dari sumber air panas Cimanggu, Tangkuban Perahu tahan, Gunung Pancar tahan sampai temperatur 70 °C pada medium SMA.

Hasil identifikasi gen penyandi 16S-rRNA, isolat CG-10 memiliki kemiripan dengan *B. caldoolyolyticus*, yaitu sebesar 98,305 %. Isolat ini dengan *B. thermoterrestris* kemiripannya sebesar 99,121 %. Walaupun dengan *B. thermoterrestris* kemiripannya lebih besar dari *B. caldoolyolyticus* namun kekerabatannya lebih dekat dengan *B. caldoolyolyticus* hal ini terjadi karena jumlah nukleotida yang dibandingkan maupun jumlah nukleotida yang overlap, *B. caldoolyolyticus* lebih banyak dari pada *B. thermoterrestris* (jumlah nukleotida 1516 dan 590 nukleotida yang overlap untuk *B. caldoolyolyticus* sedangkan *B. thermoterrestris* jumlah nukleotida yang dibandingkan 1444 dan 569 nukleotida yang overlap). Isolat CG-10 yang berasal dari sumber air panas Cagar ini bila dibandingkan dengan isolat yang berasal dari sumber air panas Cimanggu memiliki kemiripan sebesar 95,345 %, dengan *B. caldovelox* yang hidup di sumber air panas Gunung Pancar kemiripannya sebesar 95,517 %, dan dengan *B. sp.* Papandayan sebesar 95,862 %. Jika dibandingkan dengan kebanyakan isolat yang tergolong dalam mikroorganisme termofil (berdasarkan data sekuen DNA penyandi 16S-rRNA koleksi *European Bioinformatics Institute*), isolat CG-10 ini memiliki kemiripan lebih dari 90 %. Publikasi mengenai karakterisasi enzim protease yang dihasilkan oleh *B. caldoolyolyticus* sejauh ini belum pernah dilaporkan.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa isolat CG-10 mampu menghasilkan protease ekstraseluler pada media SMA (*Skim Milk Agar*) yang ditandai dengan pembentukan zona bening di sekeliling koloni sel. Nisbah diameter zona bening dengan diameter koloni yang dinyatakan dengan indeks proteolitik dari koloni isolat ini sebesar 3,3. Bila dibandingkan dengan isolat dari sumber air panas Cagar lainnya yang mempunyai indeks proteolitik besar, yaitu isolat CG-11 (indeks proteolitik 2,75) dan CG-12 (indeks proteolitik 3,3) maka kultivasi baik di medium LB, Thermus dan limbah cair tahu, isolat CG-10 menunjukkan aktivitas proteolitik paling tinggi. Ditinjau dari segi produktivitas, ternyata medium limbah cair tahu (komposisi: limbah tahu berasal dari pabrik tahu Sepanjang + skim 1,5 %) merupakan medium yang cocok bagi isolat CG-10, karena mengandung banyak protein (1,362 mg/mL). Pemakaian limbah cair tahu memiliki nilai ekonomis karena selain membantu menangani masalah limbah, juga dapat mengubah limbah tersebut menjadi produk yang bermanfaat, yaitu enzim.

Produksi dan Isolasi Protease Mikroorganisme Termofil Penghasil Protease yang Hidup di Cagar Jawa Timur, isolate CG-10

Pada medium limbah cair tahu, isolat menghasilkan protease dengan aktivitas tertinggi pada jam ke 18, yaitu pada fase stasioner [11], oleh karena itu pemanenan dilakukan pada jam tersebut dan selanjutnya dilakukan isolasi protease. Isolasi protease ekstraseluler dari isolat CG-10 dalam penelitian ini menggunakan garam amonium sulfat. Amonium sulfat adalah garam yang dapat dipergunakan untuk mengendapkan protein dengan menggunakan prinsip *salting-out*. Pada proses penambahan ini, amonium sulfat mengikat molekul air yang mengelilingi protein sehingga protein mengendap. Amonium sulfat memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan pelarut yang lain, yaitu: kelarutannya tinggi, tidak bersifat toksik terhadap kebanyakan enzim, murah dan dapat meningkatkan stabilitas enzim tanpa mempengaruhi struktur protein. Bollag dan Edelstein menyatakan bahwa pengendapan protein dengan menggunakan amonium sulfat akan mempertahankan aktivitas protein sebesar 85% [10]. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa konsentrasi garam amonium sulfat yang memberikan hasil pengendapan optimal adalah 35 % (w/v). Pada konsentrasi tersebut supernatan tidak memperlihatkan adanya aktivitas proteolitik, sedangkan pada endapannya memperlihatkan aktivitas enzim tertinggi di antara perlakuan yang diberikan, yaitu sebesar 0,032 U/mL. Hasil ini bila dibandingkan dengan aktivitas protease sebelum diendapkan dengan amonium sulfat terjadi penurunan sebesar 46 %.

Pada tahap produksi, sebelum dilakukan ekstraksi enzim dilakukan pemisahan sel terlebih dahulu. Untuk pemisahan sel dipergunakan sentrifus dingin dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Pemilihan kecepatan pada tahap ini sangat penting, karena pada kecepatan terlalu rendah menyebabkan sel belum terpisah seluruhnya. Hal ini akan mengakibatkan enzim yang diperoleh mudah ditumbuhi mikroorganisme tersebut, sehingga enzim tidak tahan lama. Sebaliknya penggunaan kecepatan terlalu tinggi menyebabkan protein enzim banyak yang ikut mengendap pada tahap pemisahan sel ini, sehingga pada tahap pengendapan *crude* enzim yang diperoleh relatif sedikit. Jika proses pemisahan yang dilakukan baik, maka enzim yang diperoleh relatif banyak dan *crude* enzim protease basah (bentuk pasta) dapat tahan disimpan sampai 1 (satu) tahun dan masih memperlihatkan adanya aktivitas. Setelah dilakukan pengendapan dengan amonium sulfat 35 % dan disentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit dari 1350 mL filtrat dihasilkan 16,186 g ekstrak kasar protease dengan aktivitas katalitik sebesar 0,6 U/mL untuk ekstrak kasar (*crude*) dengan konsentrasi 1 g/mL. Adapun aktivitas spesifik sebesar 0,75 U/mg.

Karakterisasi protease mikroorganisme termofil, isolat CG-10

Temperatur optimum

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa temperatur berpengaruh terhadap aktivitas protease isolat CG-10. Pada temperatur yang rendah laju reaksi sangat kecil hal ini terlihat dari aktivitasnya, sedangkan pada temperatur yang terlalu tinggi terjadi inaktivasi enzim sehingga laju reaksi kecil bahkan dapat reaksi dapat terhenti. Enzim memiliki temperatur optimum, yaitu temperatur yang menyebabkan kecepatan reaksi menjadi maksimum jika konsentrasi enzim dan substrat konstan [12]. Kenaikan kecepatan di bawah temperatur optimumnya disebabkan oleh kenaikan energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi. Akan tetapi bila temperatur dinaikkan terus, energi kinetik molekul menjadi besar sehingga memecah ikatan-ikatan sekunder yang mempertahankan enzim dalam keadaan aslinya. Akibatnya struktur sekunder dan tersier hilang disertai hilangnya aktivitas katalik [13]. Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi (kecepatan reaksi maksimum) dihasilkan pada temperatur 80 °C, yaitu sebesar 0,6 U/mL untuk enzim dengan konsentrasi 1 g/mL. Pada temperatur 30 °C (temperatur kamar 26-31 °C), enzim tidak memiliki aktivitas. Adapun pada temperatur di atas temperatur kamar sampai dengan 65 °C aktivitas enzim meningkat. Pada temperatur 70 °C aktivitas menurun dan meningkat kembali pada temperatur 80 °C, selanjutnya di atas temperatur tersebut menurun kembali. Enzim masih memperlihatkan aktivitasnya pada temperatur 90 °C namun terlihat sangat rendah.

Protease isolat CG-10 ini memiliki kelebihan bila dibandingkan dengan isolat-isolat lain yang pernah diteliti yang berasal dari sumber air panas karena mempunyai temperatur optimum 80 °C dengan aktivitas proteolitik 0,6 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,75 U/mg. Temperatur ini jauh di atas temperatur alami isolat tersebut hidup, yaitu 50 °C. Hal ini sesuai dengan apa yang dikemukakan oleh Kenealy bahwa enzim yang dihasilkan oleh bakteri termofil memiliki temperatur optimum di atas temperatur pertumbuhan organisme penghasilnya. Sebagai pembandingan adalah isolat OB yang berasal dari Korea memiliki temperatur optimum 55 °C dengan aktivitas katalitik 0,388 U/mL. Contoh lain, isolat GP-04 yang berasal dari sumber air panas Gunung Pancar memiliki temperatur optimum 65 °C (fraksi amonium sulfat) dengan aktivitas proteolitik sebesar 0,04 U/mL [6]. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa protease alkalin termostabil dari mikroorganisme *B. licheniformis* memiliki temperatur optimum 60 °C, protease bakteritermofilik strain TLS 33 yang diambil dari perairan Thailand dapat aktif pada temperatur 70 °C [15].

Kajian pH optimum

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pH berpengaruh terhadap aktivitas protease isolat CG-10. pH berpengaruh terhadap ionisasi enzim sehingga efektifitas tapak aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat terpengaruh juga. Perubahan pH kemungkinan dapat mengubah konformasi enzim, kemungkinan pula dapat mempengaruhi gugus katalitik enzim. Hal ini akan berpengaruh terhadap pengikatan substrat dan aktivitas katalitik gugus-gugus fungsi yang ada pada tapak aktif enzim.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada pH 4 aktivitas protease sebesar 0,29 U/mL untuk enzim dengan konsentrasi 1 g/mL. Aktivitas meningkat pada pH 5 dan menurun lagi sampai pH 7. Pada pH 8 aktivitas mencapai optimal, yaitu sebesar 0,6 U/mL. Sampai pH 10 aktivitas enzim masih terlihat walaupun kemampuannya mulai menurun. Suatu pH yang menyebabkan kecepatan reaksi tinggi, pH tersebut dinamakan pH optimum [12, 15, 16]. Hames, *et al.* menyatakan bahwa penyimpangan kecil dari pH optimum menyebabkan penurunan aktivitas dan penyimpangan besar dari pH optimum menyebabkan terjadinya denaturasi enzim [17]. Dalam penelitian ini memperlihatkan bahwa penurunan satu unit pH di bawah pH optimum ternyata menyebabkan penurunan aktivitas sebesar 59 %. Demikian pula dengan peningkatan satu unit pH di atas pH optimum juga menyebabkan penurunan aktivitas sebesar 47,5 %. Protease isolat CG-10 mampu bekerja baik pada pH asam, netral maupun basa, dengan demikian dapat disimpulkan kisaran kerja protease isolat CG-10 luas (bekerja pada rentang pH 4-10). Oleh karena pH optimum dari protease ini 8, maka dapat disimpulkan protease ini termasuk protease alkalin. Berbagai penelitian memperlihatkan hasil berbeda mengenai pH optimum dari berbagai protease. Penelitian Sin Yu menunjukkan bahwa pH optimum protease hiperhaloalkalofilik adalah 9 [14]. Protease alkalin termostabil dari mikroorganisme *B. licheniformis* memiliki pH optimum 9, sedangkan protease tipe serin dari *B. stearothermophilic* memiliki pH optimum 9 dan range pH 8-10 [18]. Protease bakteri termofilik strain TLS 33 yang diambil dari perairan Thailand memiliki pH optimum 7 [14]. Protease dari *S. aureus* V 8 memiliki rentang pH 4-8, sedangkan protease serin yang diisolasi dari Bovin pancreas mempunyai range pH 6-9 [19]. Dengan membandingkan kurva pengaruh temperatur terhadap aktivitas protease, kurva pengaruh pH terhadap aktivitas protease, dan kurva aktivitas protease tampaknya protease isolat CG-10 ini terdiri dari 2 jenis protease yang bekerja pada pH dan temperatur optimum berbeda.

Stabilitas thermal (ketahanan terhadap panas) protease isolat CG-10

Hasil analisis data menunjukkan bahwa protease

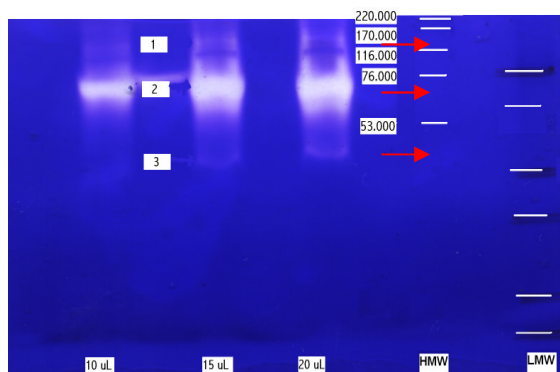
isolat CG-10 pada temperatur optimum (80 °C) hanya dapat bertahan sampai dengan 80 menit inkubasi. Pada lama inkubasi 20 menit dan 40 menit terjadi penurunan aktivitas, berturut turut sebesar 71,88 % dan 74,48 %. Pada menit ke 60 terjadi penurunan sebesar 76,88 %. Pada lama inkubasi 80 menit terjadi penurunan yang tajam, yaitu 97,91 %. Penurunan aktivitas terjadi akibat pemutusan ikatan-ikatan yang mempertahankan struktur tersier protease yaitu putusannya ikatan hidrogen, ikatan ionik, dan ikatan hidrofobik. Panas dapat menyebabkan protease terdenaturasi sehingga susunan tiga dimensi dari rantai polipeptida terganggu, akibatnya molekul terbuka menjadi struktur acak walaupun tidak sampai terjadi kerusakan pada struktur kerangka kovalen [16].

Berat molekul dan jenis protease isolat CG-10

Penentuan berat molekul dengan SDS-PAGE memperlihatkan bahwa ekstrak kasar menghasilkan 6 pita protein dengan berat molekul masing-masing > 220 kDa (pita 1), 220 kDa (pita 2), 116-170 kDa (pita 3), 53-76 kDa (pita 4 dan pita 5), < 53 kDa (pita 6). Jadi protein dalam ekstrak kasar isolat CG-10 termasuk protein berberat molekul tinggi. Untuk menentukan protein hasil SDS yang mempunyai aktivitas proteolitik, dilakukan zimogram (elektroforesis 1 dimensi/1D). Hasil zimogram terlihat pada Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan bahwa tiga pita yang memperlihatkan aktivitas proteolitik yang ditandai dengan areal bening, pita pertama berat molekul 116-170 kDa, pita kedua berat molekul 60-76 kDa, dan pita ketiga berat molekul < 53 kDa. Adapun yang memperlihatkan aktivitas proteolitik terbesar adalah pita no 2.

Jenis protease dapat ditentukan dengan zimogram dan inhibitor. Pada penelitian ini digunakan inhibitor PMSF, EDTA dan CaCl_2 . Hasil zimogram terlihat pada Gambar 2.

Pada Gambar 2, PMSF konsentrasi 5 mM terlihat menghambat aktivitas protease isolat CG-10 hal ini ditandai dengan hilangnya area bening pada zimogram, sebaliknya EDTA 5 mM tidak mempengaruhi aktivitas protease tersebut. Pengaruh senyawa lain, yaitu CaCl_2 terhadap aktivitas protease adalah bahwa baik pada protease tanpa dialisis + CaCl_2 , dialisis + CaCl_2 , protease tanpa dialisis tanpa CaCl_2 , maupun dialisis tanpa CaCl_2 semuanya memperlihatkan aktivitas proteolitiknya. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa tanpa CaCl_2 atau ion Ca^{2+} pun enzim dapat memperlihatkan aktivitasnya. Namun bila dibandingkan reaksi enzimatik antara protease dengan CaCl_2 dan protease tanpa CaCl_2 , maka protease tanpa CaCl_2 aktivitas proteolitiknya lebih besar. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa CaCl_2 dengan konsentrasi 5 mM sedikit menghambat aktivitas proteolitik isolat CG-10.



Gambar 1. Hasil zimogram menggunakan substrat kasein dengan konsentrasi sampel 10 µL, 15 µL, dan 20 µL. (1: pita 1, 2: pita 2, dan 3: pita 3)

Protease isolat CG-10 dihambat oleh senyawa PMSF, tidak dihambat oleh EDTA dan sedikit dihambat oleh CaCl₂, maka protease ini dapat dikelompokkan dalam protease serin. Selain itu, protease ini mempunyai pH optimum 8 maka dapat dikelompokkan dalam protease serin alkalin.

Faktor pH isoelektrik (pH_i) protease isolat CG-10.

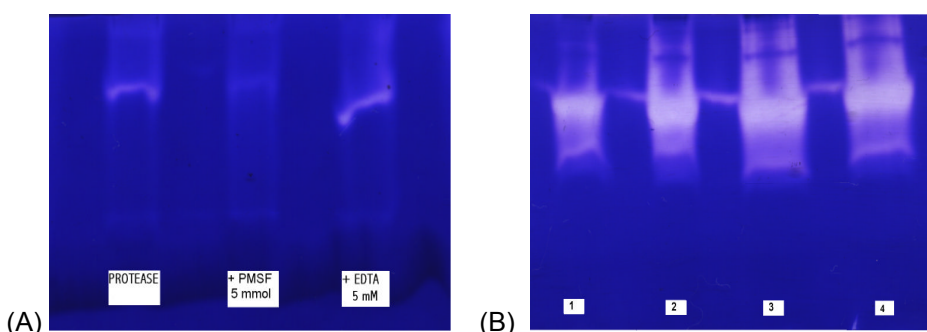
Hasil IEF (elektroforesis 2 dimensi/2D) menunjukkan bahwa dalam *crude* protease isolat CG-10 terdapat 2 kelompok protease yang mempunyai pH_i sangat berbeda. Kelompok pertama mempunyai pH_i tinggi, yaitu: no. 1, 2, dan 3, dengan pH_i berturut turut 7,5, 8,2 dan 8; berat molekul berturut-turut ± 76 kDa., ± 65 kDa., dan ± 60 kDa. Kelompok kedua mempunyai pH_i rendah, yaitu no. 4 dan 5, dengan pH_i 4,65 dan 5,1. Berat molekul keduanya kurang dari 53 kDa. Hasil

elektroforesis 1D menunjukkan bahwa ada 3 protease dengan berat molekul yang berbeda. Protease dengan berat molekul 53-116 kDa memiliki aktivitas paling besar. Ternyata setelah dilakukan pemisahan dengan elektroforesis 2D terlihat bahwa protease tersebut merupakan kumpulan 3 protease yang masing-masing memiliki berat molekul ± 76 kDa., ± 65 kDa., dan ± 60.000 dengan pH_i yang berbeda. Protease dengan berat molekul < 53 kDa yang terlihat pada elektroforesis 1D juga terpisah menjadi 2 protease dengan pH_i yang berbeda.

Harga V_{maks} dan K_M protease isolat CG-10.

Untuk mengetahui harga V_{maks} dan K_M dilihat dari hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi yang terukur dari aktivitas protease tersebut dalam menghidrolisis substrat per satuan waktu (menit). Tabel 1 menyatakan hubungan antara 1/[S] dan 1/V pada reaksi dari protease isolat CG-10 dengan substrat.

Gambar 3 menyatakan hubungan antara 1/V_{maks} dan 1/K_M. Harga 1/K_M diperoleh dari perpotongan antara garis y = 15,811x + 1,6055 dengan sumbu x. Dengan memasukkan harga x = 0, maka dapat diperoleh harga x sebesar - 0,10154. Jadi 1/K_M = - 0,10154, maka diperoleh harga K_M sebesar 9,8, sedangkan harga V_{maks} diperoleh dari perpotongan antara garis y = 15,811x + 1,6055 dengan sumbu y. Dengan memasukkan harga x = 0 ke dalam persamaan tersebut, maka diperoleh harga y = 1,6055. 1/V_{maks} = 1,6055, maka diperoleh harga V_{maks} sebesar 0,622 unit menit⁻¹.

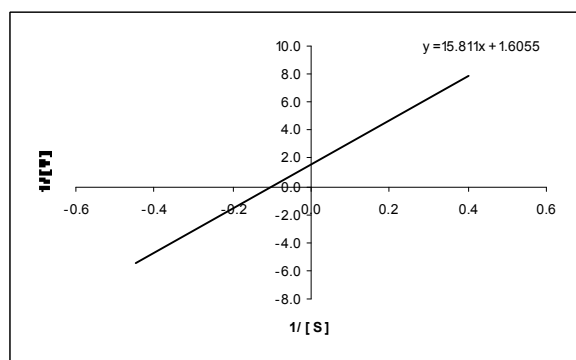


Gambar 2. A. Hasil zimogram dengan penambahan PMSF dan EDTA dalam konsentrasi 5 mM. B. Hasil zimogram dengan substrat kasein: (1) dialisat+CaCl₂, (2) protease tanpa dialisis tanpa CaCl₂, (3) dan (4) dialisat tanpa CaCl₂.

Tabel 1. Kecepatan reaksi protease (V) dari isolat CG-10 dalam variasi konsentrasi substrat [S]

Pengamatan	Konsentrasi substrat (g/mL)							
	2.50	5.00	7.50	10.00	12.50	15.00	17.50	20.00
1	0.143	0.207	0.218	0.279	0.332	0.350	0.453	0.521
2	0.126	0.225	0.232	0.277	0.317	0.382	0.459	0.656
3	0.116	0.224	0.237	0.295	0.322	0.333	0.451	0.625
Rerata	0.1284	0.2187	0.2289	0.2835	0.3237	0.3550	0.4540	0.6007

Keterangan: Protease 0,1 g/mL



Gambar 3. Grafik tentang hubungan antara $1/V_{maks}$ dan $1/K_M$

Hasil analisis regresi antara konsentrasi substrat [S] dengan kecepatan reaksi (V) diperoleh persamaan $y = 0,0233x + 0,0615$. Bila $y = 0,622$ (harga V_{maks}), maka akan diperoleh harga $x = 24,005$. Jadi konsentrasi substrat yang diperlukan untuk mendapatkan kecepatan reaksi sebesar $0,622 \text{ unit menit}^{-1}$ adalah $24,005 \text{ mg/mL}$.

KESIMPULAN

Di sumber air panas Cangar terdapat mikroorganisme penghasil protease, selanjutnya disebut isolat CG. Isolat CG-10 memiliki kemampuan memproduksi protease paling tinggi. Berdasarkan ciri morfologi, fisiologi dan gen 16S-rRNA, isolate CG-10 memiliki kemiripan dengan *B. caldxylolyticus*, yaitu sebesar 98,305 %. Karakter protease hasil isolasi dari mikroorganisme termofilik isolat CG-10 yang hidup di sumber air panas Cangar-Jawa Timur adalah: (1) memiliki temperatur optimum $80 \text{ }^\circ\text{C}$, (2) pH optimum 8, (3) ketahanan terhadap temperatur $80 \text{ }^\circ\text{C}$ sampai 60 menit inkubasi, pada menit ke 80 protease hampir kehilangan seluruh aktivitasnya, (4) berat molekul protease yang memiliki aktivitas terbesar adalah $60.000 - 76 \text{ kDa}$ dengan harga pH_i antara 7,5 sampai dengan 8,2, (5) jenis protease adalah protease serin alkalin, (6) , (6) harga V_{maks} $0,622 \text{ unit. menit}$ dan K_M $9,8 \text{ } \mu\text{mol/L}$

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa protease mikroorganisme termofilik yang hidup di sumber air panas tergolong alkalin, oleh karena itu disarankan untuk dimanfaatkan di industri deterjen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Dr. Maggy Thenawijaya (IPB), Prof. dr. Purnomo Suryohusodo, dan Prof. Dr. Ami Suwandi, Apt (Universitas Airlangga) yang telah berkenan memberi bimbingan untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wiseman, A., 1985., *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York.
2. Edward, C., 1990, *Microbiology of Extreme Environments*, Open University Press, London.
3. Tmamakashi, M., Yamagishi, A., and Oshima, T., 1995, *J. Molec. Microbiol.* 16 (5), 1031 – 1036.
4. Brock, TD., Madigan, MT., Martinko, JM., and Parker, J., 1994, *Biology of Microorganism.* 7th.ed. Prentice-Hall International, London.
5. Madigan, MT. and Marris, BL., 1997, *Sci. Am.*, 4.
6. Nisa, 2001, *Pemurnian dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Termofilik GP-04.* Makalah Seminar Program Pasca Sarjana IPB.
7. Dirnawan, H., 1999, *Isolasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler Dari Sumber Air Panas Gunung Pancar*, Skripsi Jurusan Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor.
8. Govordhan, CP. and Margolin, AL., 1996. *J. Biochem. & Indus. Feature.*
9. Bergmeyer, H.U. and Grassl, G., 1983, *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim.
10. Bollag, D.M. and Edelstein, S.J., 1991, *Protein Methods*, Wiley-Liss, Inc., New York
11. Agustini, R. 2003, *Karakterisasi Dan Imobilisasi Mikroorganisme Thermofilik Yang Hidup Di Sumber Air Panas Cangar Malang*, Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
12. Stryer, L., 1988, *Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman and Company, New York.
13. Xin Yu, T., 1996, *Purification and Properties of Protease From a Haloalkaliphilic Bacterium.* Thailand.
14. Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, Penerbit Universitas Indonesia Press, Jakarta.
15. Lehninger, AL., 1990. *Dasar-dasar Biokimia*, (terjemahan Thenawidjaja, M.), Penerbit Erlangga, Jakarta.
16. Hames, B.D., Hooper, N.M., and Houghton, J.D., 1997, *Biochemistry*, Bios Scientific Publisher, Singapore.
17. Xin Yu, T., 1996, *Purification and Properties of Protease From a Haloalkaliphilic Bacterium.* Thailand.
18. Noorzaliha A.R., Razak, C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, Z.W., and Salleh, A.B., 1994, *Appl. Microbiol. & Biotech.* 40, 822 – 827.
19. Sinchaikul, S., Sritanau, Domchai, H., and Phutrakul, S., 1998, *Production and Characterization of Extracellular Protease Produced by a Thermophilic Bacterium Strain TLS 33.* Departemen of Chemistry, Bangkok.