

THE CHARACTERISTIC CHANGES OF PROTEASE CG-10 IMMOBILIZED BY BENTONITE

Perubahan Karakter Protease Isolat CG-10 yang Diimobilisasi dengan Bentonit

Rudiana Agustini

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

Received 25 February 2005; Accepted 1 May 2005

ABSTRACT

The CG-10 isolate is a thermophile microorganism live in extreme environments, a hot spring located at Cangar East Java, having temperature 50 °C. The isolate had following characteristics: rod shaped cells, gram-positive, size of cells 6-14 µm, aerobic, and obligate thermophile. Based on the nucleotide sequences of its 16S-rRNA gene indicated that these isolate was closely related to *Bacillus caldoolyolyticus* (98.305% sequence similarity). The enzymes produced by thermophile microorganism were usually active at a higher temperature than that of the environment in which they live. Therefore it is possible to use this enzyme in industries requiring high temperature in their production processes. The CG-10 isolate grew well in a liquid waste of tofu and could secretion extracellular protease. The protease was isolated by fractioning at 35% (w/v) ammonium sulfate, centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes, and had the following characteristics: optimum temperature 80 °C, optimum pH 8, the molecular weight 53.000-76.000 Dalton (for the protease showing the highest activity), pI value between 7.5 up to 8.2, and could be classified as a serine alkaline protease. For increasing the efficiency of this protease in industries had been done by immobilization with bentonite. The immobilization process is done at optimum pH (pH 5). The characteristic changes research of protease CG-10 isolate immobilized by bentonite had been done. The immobile enzyme showed different characteristics for that of the native (mobile enzymes). The immobile enzyme showed a different optimum temperature, a higher heat resistance but the same optimum pH as the native enzyme.

Keywords: *Bacillus caldoolyolyticus*, protease, immobilization

PENDAHULUAN

Protease yang bersumber dari mikroorganisme di industri banyak dimanfaatkan karena memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan protease dari sumber lain, misalnya tanaman maupun hewan. Contoh pemanfaatan protease adalah pada industri kulit untuk pembuatan deterjen, industri keju, industri pengolahan daging, sereal, buah, minuman dan roti. Selama ini industri masih banyak memanfaatkan protease yang bersumber dari mesofil, yaitu mikroorganisme yang hidup pada lingkungan dengan temperatur < 50 °C. Saat ini terdapat kurang lebih 20 kelompok penelitian di Amerika Serikat, Jepang, Jerman aktif mencari mikroorganisme yang hidup di lingkungan ekstrem yaitu mikroorganisme termofilik. Hanya sedikit enzim yang berhasil diperoleh, hal ini dikarenakan kesulitan dalam mengkondisikan mikroorganisme tersebut di laboratorium sebagaimana mikroorganisme ini hidup dalam lingkungan alaminya.

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 [1, 2]. Mikroorganisme yang ada di sumber air panas Cangar belum banyak diteliti, terutama pemanfaatan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut. Telah berhasil diisolasi protease dari mikroorganisme termofilik isolat CG-10 yang hidup di sumber air panas Cangar Jawa Timur. Isolat ini adalah hasil pemurnian dari isolat CG (Cangar) dengan ciri-ciri: koloni berbentuk bundar, warna putih kecoklat-coklatan, indeks proteolitik 3,3, sel berbentuk batang dan bersifat gram positif serta berukuran 6-14µm, aerob, termofilik obligat [3]. Hasil identifikasi gen penyandi 16S-rRNA, isolat CG-10 memiliki kemiripan dengan *B. caldoolyolyticus* sebesar 98,305%. Pada proses industri yang menggunakan enzim, 59% yang

digunakan adalah protease [4]. Secara tradisional, industri menggunakan enzim dari tanaman dan hewan, namun dengan perkembangan teknologi saat ini industri banyak memanfaatkan mikroorganisme terutama bakteri untuk produksi protease. Data yang telah dipublikasikan memperlihatkan bahwa protease bakteri mencapai pangsa pasar 254,6 juta US\$. Nilai ini jauh lebih besar bila dibandingkan dengan protease yang bersumber dari tanaman misalnya: papain, pangsa pasarnya mencapai 15 juta US\$ [5]. Protease mikroorganisme termofilik memiliki kelebihan bila dibandingkan dengan mesofil bila dipergunakan dalam industri.

Penggunaan enzim mobil/bebas/*native* di industri memiliki beberapa kelemahan, salah satu di antaranya adalah hanya dapat digunakan dalam satu kali reaksi. Kelemahan ini dapat diatasi dengan penggunaan enzim imobil. Untuk imobilisasi enzim diperlukan matriks pendukung, salah satu di antaranya adalah bentonit. Bentonit memiliki kelebihan bila dibandingkan dengan matriks pendukung lainnya karena memiliki struktur berlapis dan di *interlayer* terkandung ion-ion logam yang mampu mengikat senyawa organik termasuk protease.

Aktivitas enzim pada umumnya dan protease khususnya dipengaruhi oleh pH dan temperatur. Efisiensi penggunaan enzim di industri sangat ditentukan oleh aktivitas enzim tersebut dalam menghidrolisis substrat. Masing-masing enzim mempunyai pH dan temperatur yang memperlihatkan aktivitas maksimum, disebut pH dan temperatur optimum [6, 7]

Menurut Godfrey dan Reichet [4], banyak perubahan karakteristik yang ditemukan pada enzim imobil dibandingkan dengan bentuk enzim mobil, antara lain: kecepatan reaksi, pH optimum, dan temperatur optimum. Atas dasar latar belakang tersebut telah dilakukan suatu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui perubahan karakter protease yang diimobilisasi dengan bentonit, yang meliputi temperatur dan pH optimum dan stabilitas termal.

METODE PENELITIAN

Bahan

Penelitian ini menggunakan protease yang diisolasi dari isolat CG-10, suatu termofil yang hidup di sumber air panas Cangar Jawa Timur, bahan uji aktivitas proteolitik metode Walter, dan bentonit produksi Sigma (katalog: EC No. 215-108-5). Semua bahan kimia yang digunakan berkualitas analitik (p.a), kecuali untuk kultivasi isolat CG-10 berkualitas teknis.

Alat

Seperangkat *shaker waterbath* (Clifton), sentrifuse dingin (Mistral 6000), laminar air flow (Dalton), pH-meter, spektrofotometer (Novaspec), SEM, dan peralatan lain yang dipergunakan dalam laboratorium.

Prosedur Kerja

Isolasi protease

Inokulum yang berisi isolat CG-10 ditumbuhkan dalam medium limbah cair tahu (komposisi: limbah cair tahu + skim 1,5%) dan dikultivasi dalam *shaker waterbath* selama 18 jam, temperatur 65 °C. Setelah 18 jam dipanen dan dilakukan pemisahan biomassa sel dengan jalan sentrifus (kecepatan 3500 rpm selama 10 menit). Filtrat yang diperoleh berisi protease ekstraseluler. Protease diisolasi dengan cara menambahkan ammonium sulfat sebanyak 35% (w/v) ke dalam filtrat hasil pemisahan biomassa sel sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan magnetik *cbulics* selama ± 30 menit dan didiamkan selama ± 1 jam. Selanjutnya disentrifus dengan sentrifus dingin, kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh berisi ekstrak protease (protease kasar/*crude*).

Penentuan temperatur optimum protease mobil dan imobil

Penentuan temperatur optimum protease mobil dilakukan dengan cara mereaksikan enzim (konsentrasi 9 g/mL) dengan substrat (kasein) dalam buffer pH 8, selanjutnya diinkubasi pada temperatur yang bervariasi, yaitu kamar (30 °C) sampai 125 °C selama 10 menit dan dilakukan pengukuran aktivitas. Untuk pengukuran aktivitas menggunakan metode Walter [7]. Temperatur yang memperlihatkan aktivitas maksimum adalah temperatur optimum.

Pada protease imobil ditambahkan substrat dan 0,5 mL buffer pH 8, selanjutnya divortex selama 1 menit dan diinkubasi pada variasi temperatur 30 °C sampai 125 °C selama 10 menit. Selanjutnya disentrifuse, filtrat dipergunakan untuk menentukan aktivitas proteolitik dan endapan direaksikan kembali dengan substrat sampai enzim tidak memperlihatkan aktivitas sama sekali. Aktivitas pada masing-masing temperatur dihitung, kemudian ditentukan temperatur yang memperlihatkan aktivitas tertinggi. Kontrol menggunakan protease imobil yang sudah dimatikan enzimnya.

Penentuan pH optimum protease mobil dan imobil

Penentuan pH optimum protease mobil dilakukan dengan cara mereaksikan enzim

(konsentrasi 0,1 g/mL) dengan substrat (kasein) dalam buffer yang memiliki pH dan variasi pH 4-10 selanjutnya diinkubasi pada temperatur optimum dan dilakukan pengukuran aktivitas menggunakan metode Walter [7]. pH yang memperlihatkan aktivitas maksimum adalah pH optimum.

Pada protease imobil ditambahkan substrat dan 0,5 mL buffer dengan variasi pH 4–10 selanjutnya divortex selama 1 menit dan diinkubasi pada temperatur optimum protease imobil selama 10 menit. Selanjutnya disentrifus, filtrat dipergunakan untuk menentukan aktivitas proteolitik dan endapan direaksikan kembali dengan substrat sampai enzim tidak memperlihatkan aktivitas sama sekali. Aktivitas pada masing-masing pH dihitung, kemudian ditentukan pH yang memperlihatkan aktivitas tertinggi. Kontrol menggunakan protease imobil yang sudah dimatikan enzimnya.

Penentuan stabilitas termal (ketahanan panas) protease mobil dan imobil.

Penentuan stabilitas termal protease mobil dilakukan dengan cara mereaksikan enzim dan substrat dalam buffer pH optimum, larutan diinkubasi pada temperatur optimum. Variasi waktu inkubasi 10 menit, 20 menit, 30 menit dan seterusnya sampai enzim tidak memperlihatkan aktivitas sama sekali.

Penentuan stabilitas termal protease imobil dilakukan dengan cara menambahkan substrat dan 0,5 mL buffer pH optimum ke dalam protease imobil, dan diinkubasi pada temperatur optimum. Variasi waktu inkubasi 10 menit, 20 menit, 30 menit dan seterusnya sampai enzim tidak memperlihatkan aktivitas sama sekali. Selanjutnya disentrifus, filtrat dipergunakan untuk menentukan aktivitas proteolitik dan endapan direaksikan kembali dengan substrat sampai enzim tidak memperlihatkan aktivitas sama sekali. Aktivitas pada masing-masing waktu inkubasi dihitung, kemudian dibuat grafik yang menyatakan hubungan antara lama inkubasi dengan aktivitas enzim. Kontrol menggunakan protease imobil yang sudah dimatikan enzimnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis pH Optimum Protease Mobil dan Imobil

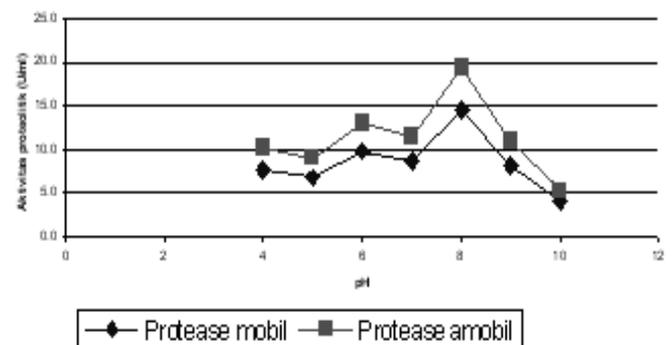
Hasil pengamatan aktivitas proteolitik protease pada pH 4 sampai dengan 10 (pengukuran dilakukan pada temperatur optimum protease mobil, 80 °C dan pH imobilisasi 5) terlihat pada Gambar 1.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pH berpengaruh terhadap aktivitas protease isolat CG-10, baik pada protease mobil maupun imobil. Faktor 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.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa pH 4 menghasilkan total aktivitas proteolitik sebesar 0,355 U/mL, pH 5 total aktivitas yang dihasilkan naik menjadi 0,562 U/mL, selanjutnya berturut-turut aktivitas menurun pada pH 6 dan 7. Derajat keasaman (pH) 7 menghasilkan aktivitas paling kecil di antara perlakuan yang diberikan, selanjutnya aktivitas naik kembali menjadi 1,562 U/mL pada pH 8 dan selanjutnya menurun pada pH 9 dan 10. Aktivitas tertinggi dihasilkan pada pH 8.

Menurut Hartmeier [9], protease yang terikat pada matriks polikationik (bentonit adalah karier yang banyak mengandung kation) pada umumnya pH optimum bergeser ke arah asam. Hal ini ini dikarenakan muatan pada permukaan karier mengubah lingkungan mikro dari enzim yang terikat pada karier tersebut. Muatan polikationik mempengaruhi banyak ion dengan muatan berlawanan (dalam hal ini muatan negatif) di sekitar ikatan enzim. Suatu enzim yang mempunyai aktivitas maksimum pada pH 8 akan mendapat pH 8 ini dalam lingkungan mikronya, sedangkan lingkungan makro mempunyai konsentrasi H^+ lebih tinggi atau pH lebih rendah dari 8. Jadi pH optimum akan bergeser ke arah asam (lebih kecil dari 8). Berdasarkan hasil penelitian terhadap protease isolat CG-10 yang diimmobilisasi dengan bentonit memiliki pH optimum sama dengan protease mobil yaitu 8. Hal ini dapat dijelaskan bahwa pergeseran pH optimum dapat ditentukan oleh faktor lain, yaitu ukuran molekul enzim dan tempat enzim terikat. Protease isolat CG-10 termasuk protein berat molekul tinggi (*HMW/high molecular weight*), yaitu 53.000 – 76.000 Dalton [4]. Berat molekul protein



Gambar 1 Aktivitas proteolitik protease mobil dan protease imobil pada variasi pH

merupakan manifestasi ukuran molekul, ukuran molekul yang besar mempengaruhi jarak pusat katalitik dari permukaan karier. Jarak yang terlalu besar dengan permukaan karier tidak dipengaruhi oleh muatan permukaan. Walaupun pH optimum protease imobil dengan mobil sama namun aktivitas proteolitik yang dihasilkan (pada temperatur optimum protease mobil / 80 °C), untuk protease imobil lebih tinggi dari pada protease mobil. Hal ini dikarenakan protease imobil dapat digunakan secara berulang.

Temperatur Optimum Protease Mobil dan Imobil

Penelitian menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi untuk protease mobil dihasilkan pada temperatur 80 °C, yaitu sebesar 0,6 U/mL (konsentrasi enzim 1 g/mL). Pada temperatur 30 °C (temperatur kamar 26 °C - 31 °C) enzim tidak memiliki aktivitas, sedangkan 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.

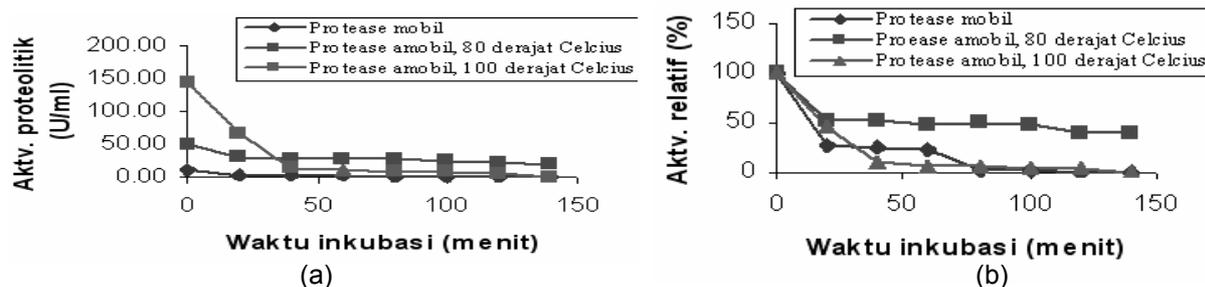
Protease imobil pada temperatur 30 °C tidak memiliki aktivitas, sedangkan pada temperatur di atas 40 °C berangsur-angsur naik sampai 70 °C, selanjutnya aktivitas menurun sangat tajam sampai dengan temperatur 85 °C. Secara berangsur-angsur aktivitas naik kembali dan aktivitas tertinggi dihasilkan pada temperatur 100 °C, yaitu sebesar 145,23 unit untuk 1 g *crude* enzim. Setelah 100 °C aktivitas berangsur-angsur menurun sampai temperatur 125 °C. Pada temperatur 125 °C enzim masih memperlihatkan aktivitas relatif tinggi. Rentang temperatur untuk aktivitas protease yang diimmobilisasi dengan bentonit adalah luas, yaitu 40 °C - 125 °C. Hal ini dikarenakan protease terlindungi dalam kisi-kisi bentonit.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa total aktivitas protease imobil lebih besar bila dibandingkan dengan protease mobil pada semua temperatur inkubasi. Kedua macam jenis protease

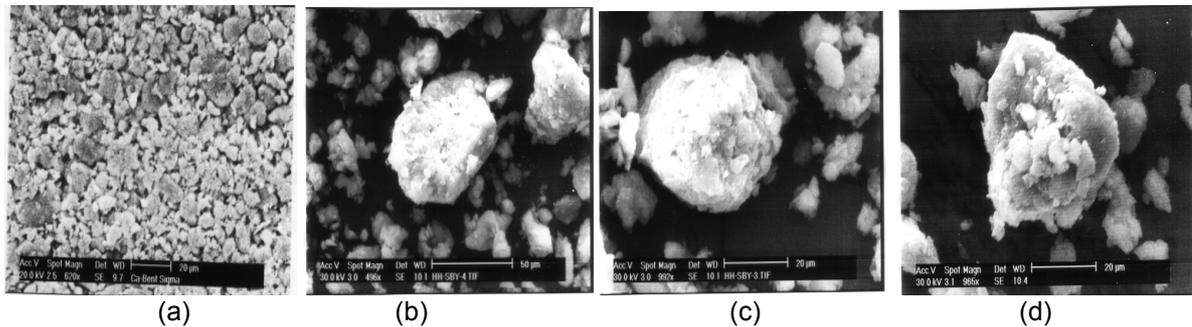
ini pada temperatur 30 °C tidak memperlihatkan aktivitas, namun pada temperatur 40 °C aktivitas protease imobil 28,5 kali protease mobil. Berturut-turut pada temperatur 50 °C sampai 90 °C menunjukkan aktivitas protease imobil 23,7 kali, 16,31 kali, 18,28 kali, 4,23 kali, 4,5 kali, 57,87 kali. Pada temperatur di atas mulai 95 °C protease mobil sudah tidak memperlihatkan aktivitasnya, hal ini berbeda dengan aktivitas protease imobil pada temperatur ini meningkat sangat tajam, dan tertinggi dicapai pada temperatur 100 °C, yaitu sebesar 145,23 U. Pada temperatur 125 °C protease imobil menunjukkan aktivitas sebesar 1,9 kali protease mobil pada temperatur optimumnya. Jadi dapat disimpulkan protease imobil lebih baik dari protease mobil dalam hal aktivitas yang dihasilkan. Imobilisasi protease dengan bentonit mengakibatkan perubahan temperatur optimum, yaitu 80 °C untuk protease mobil dan 100 °C untuk protease imobil.

Stabilitas Thermal (Ketahanan Panas) Protease Mobil dan Imobil

Hasil uji ketahanan terhadap temperatur 80 °C (temperatur optimum protease mobil) dan temperatur 100 °C (temperatur optimum protease imobil) dari protease imobil terlihat pada Gambar 2. Gambar tersebut memperlihatkan bahwa protease imobil pada temperatur 80 °C memiliki ketahanan terhadap panas lebih baik bila dibandingkan dengan protease mobil maupun protease imobil pada temperatur 100 °C. Pada temperatur 100 °C walaupun terlihat ketahanan panas kurang baik, namun aktivitas yang dihasilkan masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan protease mobil pada semua lama inkubasi. Pada temperatur 80 °C kestabilan termal protease imobil dicapai pada menit ke 20 sampai dengan 100, namun pada menit sebelumnya terjadi penurunan yang banyak yaitu sebesar 47,81% relatif. Kestabilan protease mobil pada temperatur 80 °C dicapai pada menit ke 20 sampai dengan 60, namun pada menit sebelumnya terjadi penurunan sebesar 71,88 % dari aktivitas sebelumnya.



Gambar 2 Kurva aktivitas proteolitik (a) dan kurva aktivitas relatif (b) protease isolat CG-10 dalam variasi bentuk protease, temp. dan waktu inkubasi



Gambar 3 Analisis mikroskopis bentonit: (a) sebelum mengikat protease/perbesaran 620 kali; (b) bentonit setelah mengikat protease/ perbesaran 496 kali, (c) bentonit setelah mengikat protease/perbesaran 992 kali, dan (d) bentonit setelah mengikat protease/965 kali.

Analisis Kristal Bentonit Sebelum dan Sesudah Mengikat Protease (Analisis Mikroskopis Protease Imobil)

Hasil analisis mikroskopis kristal bentonit sebelum dan sesudah mengikat protease dengan SEM terlihat pada Gambar 3. Pada Gambar tersebut terlihat bahwa protease masuk ke dalam kisi-kisi bentonit setelah dilakukan imobilisasi (imobilisasi dilakukan pada pH 5), juga memperlihatkan bahwa kisi-kisi bentonit menjadi bertambah luas setelah mengikat protease.

KESIMPULAN

Nilai pH optimum protease isolat CG-10 imobil sama dengan protease mobil/native yaitu pH 8. Imobilisasi berpengaruh terhadap perubahan temperatur optimum (80 °C untuk protease mobil dan 100 °C untuk protease imobil). Imobilisasi juga mengakibatkan terjadinya perubahan stabilitas termal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. dr. Purnomo Suryohusodo, dan Prof. Dr. Ami Suwandi, Apt (Universitas Airlangga), serta Dr. Hery Haerudin (PUSPITEK LIPI Serpong) yang

telah berkenan memberi bimbingan untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nisa, 2001, *Pemurnian dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Termofilik GP-04*, Makalah Seminar Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor
2. Dirnawan, H., 1999, *Isolasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Hidrolitik Ekstraseluler Dari Sumber Air Panas Gunung Pancar*, Skripsi Jurusan Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor
3. Agustini, R., 2003, *Journal Hayati*, Edisi Khusus 2
4. Godfrey, T. and Reichet, J., 1986, *Industrial Enzymology, The Application of Enzyme in Industry* Stockton Press, London
5. Uhlig, H., 1998, *Industrial Enzyme and Their Applications*, John Wiley & Sons Inc, Ontario
6. Lehninger, AL., 1990, *Dasar-dasar Biokimia*, terjemahan Maggy Thenawidjaja, Jakarta
7. Stryer, L., 1988, *Biochemistry*, Third Edition, W.H. Freeman and Company, New York
8. Bergmeyer, H.U. and Grassl, 1983, *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2. Verlag Chemie, Weinheim
9. Hartmeier, W. 1988, *Immobilized Biocatalysts*, Springer-Verlag, Weinheim