

**KARAKTERISASI PROTEASE *Bacillus subtilis* A₁ InaCC B398
YANG DIISOLASI DARI TERASI SAMARINDA
[Characterization of Protease *Bacillus subtilis* A₁ InaCC B398
Isolated from Shrimp Paste Samarinda]**

Yati Sudaryati Soeka dan Sulistiani
Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi- LIPI
Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911
email: ceuceu_lipi@yahoo.com

ABSTRACT

Proteases is enzyme that breaks the peptide bond to produce amino acids and simpler peptides. This enzyme can be isolated from a variety of sources such as plants, animals and microbe. Alkaline proteases of microbial origin possess considerable industrial potential due to their biochemical diversity and wide applications in tannery, food, medicinal formulations and detergents. The objectives of the research was to determine the characteristics of the protease enzyme produced by strain A₁, including incubation time, substrate concentration azokasein, the optimum temperature and pH also stability. The effect of some metal ions as activators or inhibitors of the protease enzyme activity measured with a spectrophotometer at λ 280 nm. Strain A₁ was identified by using 16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis based on Neighbor Joining method. Strain A₁ protease activity was qualitatively demonstrated the presence of a clear zone around the colonies in the medium containing 1% skim milk. Result showed that the highest activity were incubation time of three days, temperature of 50 °C and pH 8.5 were 87.35 U/mL, 83.44 U/mL and 93.11 U/mL, respectively. Effect of metal ions in the form of divalent and monovalent cations at a concentration of 1 mM on protease A₁ activated by divalent cations CaCl₂, MnCl₂ while divalent cations CuCl₂, HgCl₂ and monovalent cations KCl, NaCl were inhibitors of each enzyme activity. Result from molecular identification based on 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis using Neighbor Joining method suggested that strain A₁ was *Bacillus subtilis*. The strain was registered in the InaCC collection (no. B 398).

Keywords: protease, *Bacillus subtilis*, phylogenetic analysis

ABSTRAK

Protease adalah enzim yang dapat memecah ikatan peptida menghasilkan asam amino dan peptida sederhana. Enzim ini dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti tanaman, hewan dan mikroba. Protease alkalin yang berasal dari mikroba memiliki potensi industri yang cukup besar karena keanekaragaman biokimianya dan kegunaannya yang luas di dalam industri seperti penyamakan kulit, makanan, formulasi obat dan deterjen. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik enzim protease yang dihasilkan oleh strain A₁, meliputi waktu inkubasi, konsentrasi substrat azokasein, suhu dan pH optimum serta stabilitas. Pengaruh beberapa ion-ion logam sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas enzim protease yang diukur dengan spektrofotometer pada λ 280 nm. Strain A₁ diidentifikasi secara molekuler melalui sekuensing 16S rDNA dan analisis filogenetik berdasarkan metode Neighbor Joining. Aktivitas protease strain A₁ secara kualitatif diperlihatkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni di dalam media yang mengandung 1% susu skim. Hasil yang didapat dengan aktivitas tertinggi pada waktu inkubasi tiga hari, suhu 50 °C dan pH 8,5 berturut-turut adalah sebesar 87,35 U/mL, 83,44 U/mL dan 93,11 U/mL. Pengaruh ion logam dalam bentuk kation divalen dan monovalen masing-masing pada konsentrasi 1 mM pada enzim protease strain A₁ diaktifkan oleh kation divalen CaCl₂, MnCl₂ sedangkan kation divalen CuCl₂, HgCl₂ dan kation monovalen KCl, NaCl adalah sebagai penghambat aktivitas enzim. Hasil identifikasi molekuler melalui sekuensing 16S rDNA dan analisis filogenetik berdasarkan metode Neighbor Joining strain A₁ adalah *Bacillus subtilis*. Strain telah didaftarkan di kultur koleksi InaCC dengan nomor koleksi B 398.

Kata kunci: protease, *Bacillus subtilis*, analisis filogenetik

PENDAHULUAN

Protease adalah salah satu enzim penting dan memiliki nilai ekonomi tinggi karena aplikasinya yang sangat luas di dalam industri enzim. Industri pengguna protease di antaranya adalah industri deterjen, obat-obatan, produk kulit, produk makanan dan bahkan dalam industri pengolahan limbah. Deterjen dengan beberapa merk terkenal mengandung enzim proteolitik, sebagian besar

diproduksi dari genus *Bacillus* (Nascimento dan Martins, 2006).

Enzim merupakan salah satu bahan aditif di dalam pembuatan deterjen. Menurut Matheson (1996) di dalam Timurti *et al.* (2009), aditif pembuatan deterjen sebanyak 1-2% terdiri dari enzim, pemutih, pencerah, parfum dan pewarna. Enzim yang dapat digunakan dalam deterjen harus tahan terhadap sifat-sifat komponen deterjen,

terutama senyawa pemutih, aktif pada pH 7-10 (alkalin) dan suhu yang beragam 40-65°C (Hmidet *et al.*, 2009).

Amara *et al.* (2009) memperkenalkan ide untuk menggunakan protease dan lipase sebagai biodeterjen yang dapat berdiri sendiri tanpa menggunakan bahan kimia tambahan. Enzim protease berfungsi untuk menghidrolisa noda protein pada pakaian sehingga kotoran yang mengandung protein seperti darah, lendir, keringat dan sebagainya akan mudah tercuci. Disamping itu kotoran lainnya yang terikat pada protein juga menjadi lebih mudah dihilangkan. Protease yang terdapat pada deterjen biasanya bekerja pada pH alkali dan suhu yang cukup tinggi. Alkali protease ini digunakan aditif pada deterjen karena kemampuannya yang bersifat *biodegradable* dan dapat meningkatkan kerja dari deterjen secara umum. Enzim protease sekarang digunakan sebagai pencuci sarang burung walet menggantikan bahan kimia hidrogen peroksida (H₂O₂) yang dikenal sebagai agen pemutih (*bleaching*) yang bersifat alami dan aman bagi tubuh (Rahayu *et al.*, 2013). Deterjen ramah lingkungan pun diharapkan dapat digunakan oleh masyarakat luas sebagai wujud kesadaran dalam menjaga keseimbangan ekosistem yang menjadi bagian dari lingkungan tempat tinggal dan kehidupan manusia (Nurkomalawati, 2011).

Media seleksi secara kualitatif di dalam penelitian ini adalah susu skim. Susu skim mengandung kasein, merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba karena kaya nutrisi. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease (Susanti, 2003). Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk kalsium kalsinat yang tidak larut di dalam air serta membentuk koloid berwarna putih di dalam media padat. Dengan adanya enzim proteolitik dari mikroba, kasein ini akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino ditandai dengan adanya zona bening di

sekitar koloni mikroba (Pakpahan, 2009).

Deterjen menggunakan enzim untuk menguraikan protein dan lemak. Protein dan lemak merupakan penyebab kotoran pada pakaian. Rumput, darah, dan telur, adalah contoh noda protein. Sementara lipstik, minyak, mentega, dan saus, merupakan noda lemak. Tanpa enzim, menghilangkan protein dan lemak sangat sulit dan memerlukan banyak deterjen serta suhu tinggi (Ahira, 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* A₁ dalam suasana alkalin yang dapat digunakan sebagai bahan biodeterjen yang ramah lingkungan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Persiapan Isolat

Strain-starin yang digunakan dalam penelitian ini adalah A₁, A₄ diisolasi dari terasi Udang Bonang, Samarinda dan C₄ diisolasi dari terasi curah Samarinda yang dapat mendegradasi protein di dalam susu skim. Isolat dipelihara dalam media *Nutrient Agar* (NA) miring.

Media Seleksi Enzim Protease secara kualitatif

Media protease agar (2% susu skim, 0,5% pepton, 2% agar dengan pH 8) digunakan untuk mengetahui bakteri murni yang dapat merombak protein dituangkan ke dalam cawan petri. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C di dalam inkubator selama dua hari. Hasil pengujian secara kualitatif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni mikroba (Naiola dan Widhyastuti, 2002).

Media Kultur Mikroba

Produksi inokulum dilakukan dengan cara strain A₁ ditumbuhkan pada media agar miring NA, diinkubasi pada suhu 37 °C di dalam inkubator sampai berumur tiga hari.

Media Produksi Protease.

Produksi protease dilakukan dengan metode

Cappuccino dan Sherman (1983) yang dimodifikasi dengan menginokulasikan 1 ujung ose strain A₁, A₄ dan C₄ masing-masing berumur tiga hari ke dalam 25 mL media produksi (2% susu skim, 0,5% pepton) dengan pH 8 dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu sampai enam hari di atas pengocok (*shaker*) inkubator dengan kecepatan 120 rpm. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 2 mL. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.160 xg pada suhu 4°C selama lima menit untuk memisahkan supernatan dan endapannya. Supernatan digunakan sebagai larutan mengandung enzim yang akan diuji aktivitas proteasenya.

Sesuai dengan hasil penelitian dari Chu *et al.* (1992); Mabrouk *et al.* (1999); Beg and Gupta (2003) di dalam Jamilah *et al.* (2009) bahwa lama inkubasi enzim protease dari isolat *Bacillus* adalah 24 jam (satu hari) sampai dengan 120 jam (lima hari).

Pengujian Aktivitas Protease secara Kuantitatif.

Aktivitas protease diuji dengan mengukur kadar asam amino sebagai produk hidrolisis protein dari susu skim oleh enzim protease. Larutan enzim yang menghasilkan asam amino yang terlalu tinggi diencerkan terlebih dahulu dan faktor pengenceran digunakan dalam perhitungan aktivitasnya.

Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium yang mengandung azo kasein, yang merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease dan menginduksi sintesis enzim protease alkalin (Ward, 1983; Fujiwara dan Yamamoto, 1987 di dalam Akhdiya, 2003).

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim direaksikan dengan 0,2 mL substrat 0,1% azokasein dalam larutan buffer glycin-NaOH 0,05 M dengan pH 8 dan diinkubasi pada suhu 40 °C selama 20 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,6 mL 10% asam trikloroasetat (TCA). Selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit dan supernatan dipisahkan dari endapan. Pengukuran absorbansi

supernatan dengan spektrofotometer pada λ 280 nm. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 μ g tirosin dalam kondisi pengukuran tersebut (Yang dan Huang, 1994).

Karakterisasi Protease

Pengaruh konsentrasi substrat azokasein terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan konsentrasi 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,15%, dan 0,175%.

Sedangkan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan konsentrasi substrat azokasein 0,1% dengan hasil aktivitas yang tertinggi dengan pH bufer glisin-NaOH dengan aktivitas protease tertinggi yaitu pada suhu 30-70 °C dan untuk stabilitas enzim terhadap suhu, larutan enzim protease diinkubasi dalam masing-masing suhu tanpa bufer selama 10 menit.

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim diuji dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan konsentrasi substrat azokasein 0,1% dinkubasi dalam bufer glisin-NaOH 0,05 N dengan pH 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 dan untuk stabilitas enzim terhadap pH, larutan enzim diinkubasi dalam masing-masing pH bufer selama 10 menit.

Pengaruh ion logam Ca²⁺, Mn²⁺, K⁺, Na⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ dalam bentuk garam dari masing-masing CaCl₂, MnCl₂, KCl, NaCl, CuCl₂, HgCl₂ sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas protease dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan substrat azokasein 0,1% dengan 1 mM ion logam tersebut dan dibandingkan dengan enzim tanpa penambahan logam.

Identifikasi secara molekuler strain A₁ penghasil enzim protease

Strain A₁ penghasil enzim protease tertinggi diidentifikasi secara molekuler dengan sekuensing 16S rDNA dan analisis filogenetik dengan metode *neighbor joining* menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versi 5.2

dengan *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE).

Amplifikasi 16S rDNA

DNA bakteri diisolasi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Amplifikasi 16S rDNA menggunakan metode PCR dengan primer universal yaitu 9F dan 1510R. Komposisi per reaksi sebesar 50 µL menggunakan primer 9F dan 1510R 10 mM masing-masing sebesar 1,25 µL, DNA templete 2 µL (10-100 ng), Go Taq® master mix (Promega) sebesar 25 µL, dan *Ultra pure water DNA/RNase free* 20,5 µL. Reaksi PCR menggunakan *Thermalcycler* (Takara, Shuzo, Co. Ltd.) sebagai berikut : denaturasi 95 °C selama 3 menit, dilanjutkan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 95 °C selama 30 detik, peretakan 50 °C selama 30 detik, pemanjangan 72 °C selama 90 detik. Pemanjangan akhir 72 °C selama 7 menit. Hasil produk PCR dipurifikasi, dilanjutkan dengan *cycle sequencing* dengan *template* 9F dan 1510R. Hasil *cycle* sekuensing dipurifikasi dan dilanjutkan dengan sekuensing di Genetic analyzer ABI 3130. Hasil sekuensing dicek, diedit dan disambungkan menggunakan program *Bioedit*. Sekuen 16S rDNA strain A₁ dibandingkan dengan sekuen di *database GenBank* NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) menggunakan *BLAST algorithm*.

Analisis filogenetik

Metode analisis filogenetik strain A₁ menggunakan metode *Neighbor Joining* (Saitou

dan Nei, 1987) dengan program MEGA 5.2.2. (Tamura *et al.*, 2011). Parameter – parameter yang dipergunakan: model substitusi dengan *Tamura 3-parameter model*, *gap* diperlakukan sebagai ‘*missing data*’ dan kekuatan klade diuji menggunakan metoda *bootstrap* (Efron, 1979) dengan 1000 kali pengulangan.

HASIL

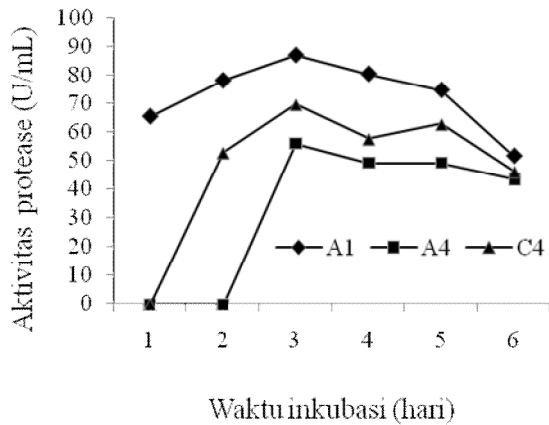
Hasil pengujian aktivitas protease secara kualitatif dan semi kuantitatif ditampilkan pada Tabel 1. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa strain A₁, A₄ dan C₄ mampu menghasilkan protease ekstraseluler pada media susu skim agar yang ditandai dengan pembentukan zona bening di sekeliling koloni sel. Nisbah diameter zona bening dengan diameter koloni yang dinyatakan dengan indeks proteolitik (semi kualitatif) dari koloni strain A₁, A₄ dan C₄ masing-masing sebesar 2,90, 2,20 dan 1,50.

Aktivitas enzim terhadap waktu inkubasi (Gambar 1) menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi strain A₁, A₄ dan C₄ didapat pada waktu inkubasi tiga hari masing-masing sebesar 87,35 U/mL, 56,06 U/mL dan 69,80 U/mL sedangkan aktivitas terendah dihasilkan pada hari keenam masing-masing sebesar 51,73 U/mL, 43,65 U/mL, 46,25 U/mL.

Strain A₁ menunjukkan aktivitas proteolitik paling tinggi sehingga penelitian selanjutnya yang diteliti (Tabel 1 dan Gambar 1).

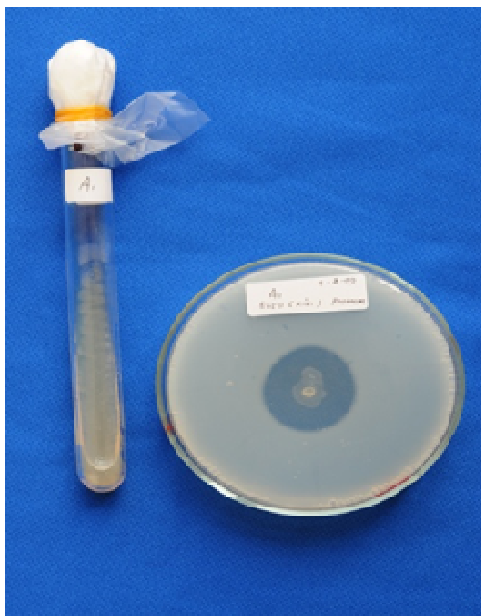
Tabel 1. Hasil uji aktivitas protease alkalin secara kualitatif dan semi-kuantitatif (*Alkaline protease activity assay results qualitatively and semi-quantitatively*)

Kode biak	Aktivitas protease (kualitatif)	Aktivitas protease (semi-kuantitatif)
A ₁	+++	2,90
A ₄	+++	2,20
C ₄	++	1,50



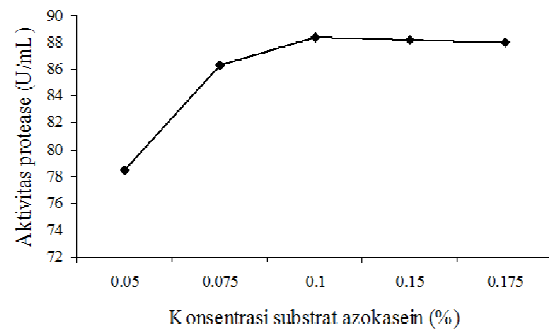
Gambar 1. Aktivitas enzim protease dari strain A₁, A₄ dan C₄

Aktivitas protease strain A₁ pada media agar yang mengandung susu skim diperlihatkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Gambar 2). Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran kemampuan isolat mikroba proteolitik merombak protein dengan membandingkan antara diameter zona bening di sekitar koloni dengan diameter koloni mikroba.



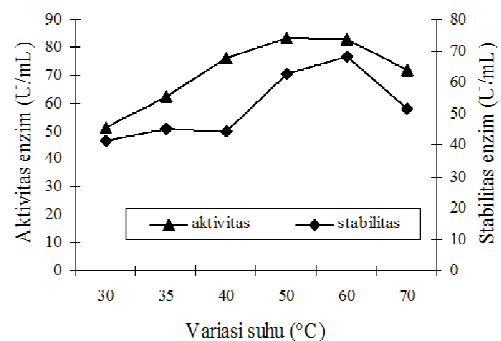
Gambar 2. Strain A₁ mendegradasi protein dalam susu skim (*Strain A₁ degraded protein in skim milk*)

Pengaruh konsentrasi substrat azokasein terhadap aktivitas enzim memperlihatkan bahwa aktivitas enzim tertinggi didapat pada konsentrasi 0,1% sebesar 88,4 U/mL. (Gambar 3). Sedangkan pada konsentrasi substrat azokasein lebih besar dari 0,1% yaitu 0,15 dan 0,175% aktivitas protease tidak mengalami kenaikan.



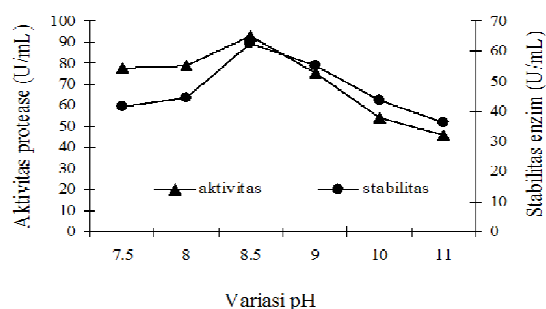
Gambar 3. Pengaruh konsentrasi substrat azokasein terhadap aktivitas protease (*Effect of substrate concentration azocasein on the activity of protease*).

Variasi suhu memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim (Gambar 4). Pada suhu 30°C sampai dengan 40°C terjadi peningkatan. Suhu 50°C merupakan suhu optimum untuk aktivitas enzim sebesar 83,44 U/mL dan pada suhu 60°C terjadi penurunan sebesar 0,74% dan pada suhu 70°C terjadi penurunan sebesar 14,17%. Uji stabilitas enzim terhadap suhu optimum 50°C terjadi penurunan sebesar 24,89%.



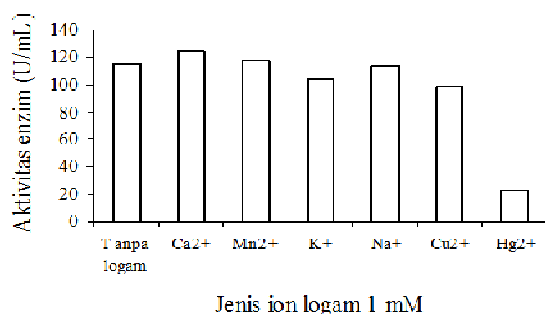
Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas enzim (*Effect of temperature on enzyme activity and stability*)

Aktivitas optimum enzim dicapai pada pH 8,5 dengan nilai aktivitas enzim sebesar 93,11 U/mL (Gambar 5). Uji stabilitas enzim setelah enzimnya diinkubasi pada pH 8,5 selama 10 menit sebesar 62,57 U/mL terjadi penurunan sebesar 32,80%. Setelah melewati pH optimum aktivitas enzim terus menurun begitupun dengan stabilitas enzimnya.



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas enzim (*Effect of pH on enzyme activity and stability*)

Terdapat zat kimia tertentu yang dapat meningkatkan aktivitas enzim (aktivator) dan dapat menghambat aktivitas enzim (inhibitor). Strain A₁ diaktifkan oleh kation divalen CaCl₂, MnCl₂ masing-masing sebesar 8,22% dan 2,13%. Sedangkan kation divalen CuCl₂, HgCl₂ dan kation monovalen KCl, NaCl merupakan inhibitor. Ion logam Cu²⁺, Hg²⁺, K⁺ dan Na⁺ menurunkan aktivitas enzim masing-masing sebesar 14,21%, 79,99%, 9,37% dan 1,46% (Gambar 6).



Gambar 6. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim (*Effect of metal ions on enzyme activity*)

Hasil analisis *DNA sequencing* 16S rDNA strain A₁ diperoleh sekuen dengan panjang 932 bp. Sekuen 16S rDNA strain A₁ dibandingkan dengan sekuen di *database GenBank* NCBI menggunakan *BLAST algorithm*. Hasil *BLAST* strain A₁ menunjukkan homologi/kesamaan 100% terhadap *Bacillus subtilis* strain CH16. Adapun klasifikasi strain A₁ sebagai berikut, kingdom: Bacteria, Filum: Firmicutes, Kelas: Bacilli, Ordo: Bacillales, Famili: Bacillaceae, Genus: Bacillus, Spesies: *Bacillus subtilis* A₁.

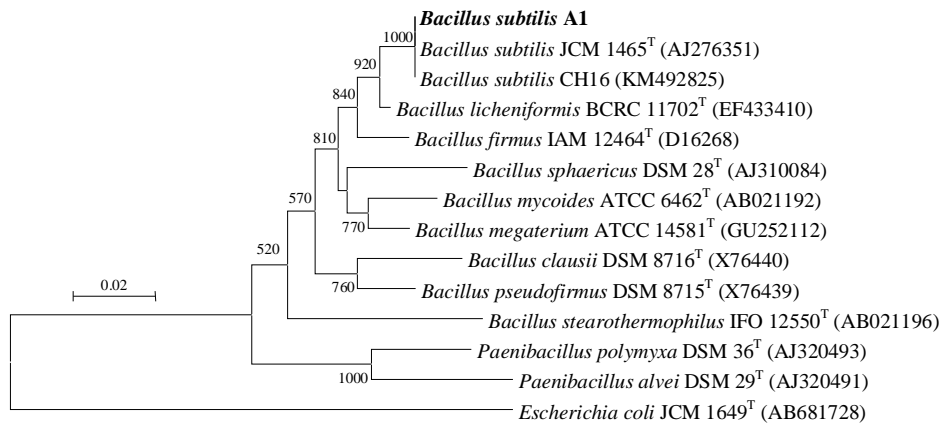
PEMBAHASAN

Kemampuan suatu mikroba dalam mengubah substrat dapat dilihat dari daerah zona bening yang terbentuk pada suatu medium tumbuh. Semakin besar daerah zona bening yang terbentuk menandakan bahwa mikroba tersebut memiliki kemampuan yang tinggi dalam mengubah substrat yang terkandung di dalam medium (Nurmalinda *et al.*, 2013).

Berdasarkan nilai indeks yang diperoleh (Tabel 1), strain A₁ dapat menghasilkan enzim protease yang tertinggi sebesar 2,90. Akhdiya (2003) menyatakan isolat dengan indeks proteolitik ≥ 3 sangat potensial untuk dikembangkan sebagai sumber protease. Penelitian ini bila dibandingkan dengan dengan penelitian Agustin, 2006 strain A₁, A₄ dan C₄ yang berasal dari terasi Samarinda mempunyai indeks proteolitik lebih kecil dari isolat CG-10 (indeks proteolitik 3,3) yang berasal dari sumber air panas Cangar batu Malang.

Zona bening di sekeliling koloni tidak mewakili jumlah protease yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme. Karena daerah bening yang dihasilkan akan bertambah dengan bertambahnya waktu inkubasi (Susanti, 2003). Sesuai dengan hasil penelitian ini bahwa strain A₄ mempunyai zona bening lebih besar dari strain C₄, tetapi aktivitas enzim protease dari strain C₄ lebih besar dari strain A₄.

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama adalah substrat, suhu, pH (tingkat



Gambar 7. Pohon filogenetik strain *Bacillus subtilis* A₁ penghasil protease berdasarkan analisis sekuen 16S rDNA menggunakan metode *Neighbor Joining* dan *Escherichia coli* JCM 1649^T (AB681728) sebagai *outgroup* (*Phylogenetic trees producing strains of Bacillus subtilis* A₁ protease based on 16S rDNA sequence analysis using *Neighbor Joining* method and *Escherichia coli* JCM 1649^T (AB681728) as *outgroup*)

keasaman). Tiap enzim memerlukan suhu dan pH optimum yang berbeda-beda karena enzim adalah protein, yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan keasaman berubah. Di luar suhu atau pH yang sesuai, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan mengalami kerusakan (Ahira, 2011). Oleh karena itu untuk mendapatkan aktivitas protease optimum dari strain A₁ ini semua aspek yang mempengaruhi kerja enzim harus diperhatikan agar didapat hasil yang maksimum.

Enzim proteolitik yang akan dimasukkan ke dalam deterjen formulasi harus memiliki beberapa karakteristik yaitu aktif dan stabil pada nilai pH basa, mempunyai aktivitas dan stabilitas yang baik pada suhu relatif tinggi (40-50 °C dan bahkan di atas), kompatibilitas dengan senyawa deterjen seperti surfaktan, parfum dan pemutih (stabilitas selama penyimpanan dan mencuci), hidrolisis spesifisitas terhadap protein yang berbeda (Adinarayana *et al.*, 2003; Kamoun *et al.*, 2008). Semua deterjen yang digunakan saat ini untuk mencuci pada pH tinggi (basa) dan suhu 50-70°C (Beg *et al.* (2003) di dalam Adinarayana *et al.*, 2003).

Enzim tertentu dapat bekerja secara optimal pada kondisi tertentu pula. Sebagian besar enzim mempunyai suhu optimum yang sama dengan suhu normal sel organisme tersebut (Kosim, 2010).

Seluruh enzim peka terhadap perubahan derajat keasaman (pH). Enzim menjadi nonaktif bila diperlakukan pada asam basa yang sangat kuat. Sebagian besar enzim dapat bekerja paling efektif pada kisaran pH lingkungan yang agak sempit. Di luar pH optimum tersebut, kenaikan atau penurunan pH menyebabkan penurunan aktivitas enzim dengan cepat. Misalnya, enzim pencernaan di lambung mempunyai pH optimum 2 sehingga hanya dapat bekerja pada kondisi sangat asam. Sebaliknya, enzim pencernaan protein yang dihasilkan pankreas mempunyai pH optimum 8,5. Kebanyakan enzim intrasel mempunyai pH optimum sekitar 7,0 (netral). Pengaruh pH terhadap kerja enzim dapat terdeteksi karena enzim terdiri atas protein. Jumlah muatan positif dan negatif yang terkandung di dalam molekul protein serta bentuk permukaan protein sebagian ditentukan oleh pH. Perubahan pH pada skala deviasi kecil dapat menyebabkan turunnya aktivitas

enzim karena dengan perubahan ionisasi gugus-gugus fungsionalnya (Hames *et al.* (2000) di dalam Putranto, 2006).

Suhu optimum dan pH optimum aktivitas enzim protease bervariasi, penelitian-penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan bahwa variasi suhu dari 40-80 °C dan pH 8-10 dalam karakteristik enzim proteolitik ekstraseluler bisa ada di antara berbagai spesies *Bacillus*. Aktivitas enzim protease dari strain A₁ yang mempunyai suhu optimum 50 °C dan pH 8,5 sesuai dengan penelitian Nadeem *et al.* (2013) dan Mubarik (2001) bahwa enzim protease alkalin dan protease imobil menunjukkan stabil hingga 50 °C dan di atas suhu ini aktivitasnya menurun.

Protease alkalin yang berasal dari mikroba dalam bidang industri mempunyai potensi yang cukup besar. Aplikasinya yang luas dalam penyamakan kulit, industri makanan, obat, formulasi deterjen dan dalam proses limbah, pengobatan, pemulihan perak dan resolusi amino asam campuran dan untuk rumah tangga (Nehra *et al.* (2002); Rao *et al.* (1998); Jamilah *et al.* (2009).

Pada saat ini, yang paling banyak dimanfaatkan sebagai sumber protease adalah mikroorganisme, terutama bakteri golongan *Bacillus*, dan kapang *Rhizopus*, *Aspergillus*, dan *Mucor*. Jenis mikroorganisme lain yang telah dilaporkan sebagai penghasil protease adalah *Proteus*, *Serratia*, *Endothia*, *Streptomyces*, *Thermus*, *Pseudomonas*, *Penicillium* dan sebagainya (Suhartono (1995); Yuratmoko *et al.* (2007); Djamel *et al.* (2009). Menurut Palsaniya *et al.* (2012) *B. subtilis* mempunyai aktivitas protease tertinggi dibandingkan dengan *Pseudomonas fluorescens*, *E.coli* dan *Serratia marscens* dan baik untuk digunakan di dalam industri deterjen.

Ion logam diperlukan dalam bentuk kation monovalen dan divalen sebagai aktivator yang dapat meningkatkan aktivitas pada enzim-enzim tertentu. Namun ion-ion tersebut dapat pula bertindak sebagai inhibitor yaitu zat yang dapat menurunkan atau menghambat aktivitas enzim pada

konsentrasi tertentu. Protease alkali dari *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., dan *Thermus* sp. memerlukan kation divalen seperti Ca²⁺, Mg²⁺ dan Mn²⁺ atau gabungan kation tersebut dan penambahan ion Ca²⁺ pada suhu tinggi akan meningkatkan kestabilan panas enzimnya (Rahayu *et al.*, 2013). Menurut Naiola and Widhyastuti (2007) ada beberapa protease yang membutuhkan ion logam tertentu untuk meningkatkan aktivitasnya di antaranya penambahan ion logam Ca²⁺ terhadap *B. pumilus* Y1.

Pengaruh penambahan ion logam dari beberapa penelitian telah dilakukan. Untuk strain A₁ ion logam Ca²⁺, Mn²⁺ sebagai aktivator dapat menaikkan aktivitas enzim hal ini sesuai dengan penelitian Adinarayana *et al.* (2003), Nascimento dan Martins (2006), ion logam Cu²⁺, Hg²⁺ sebagai inhibitor sesuai dengan penelitian Yang *et al.* (2000), Siddalingeshwara *et al.* (2010), sedangkan kation monovalen K⁺ dan Na⁺ sebagai inhibitor sesuai dengan penelitian Fuad *et al.* (2004).

Protease dari *Bacillus* banyak digunakan dalam industri makanan dan detergen sebagai contoh subtilisin komersial merupakan protease alkalin yang diproduksi oleh *B. subtilis* (Fuad *et al.*, 2004). *B. subtilis* RSKK96 sangat menjanjikan untuk dipakai di dalam industri *detergen laundry*, makanan dan farmasi (Akcan dan Uyar, 2011). Enzim yang dapat digunakan sebagai aditif deterjen enzim yang mempunyai aktivitas tinggi pada rentang pH basa (>pH 8,0), tidak terlalu dipengaruhi senyawa detergen atau ion-ion logam yang banyak di dalam detergen dan dapat bekerja pada suhu relatif luas, dingin atau panas (Fuad *et al.*, 2004 dan Agustien *et al.*, 2007). Untuk mendapatkan aktivitas enzim protease yang tinggi harus dilakukan optimasi produksi protease dan produksi enzim pada skala labu kocok dengan menggunakan optimasi produksi enzim. Hasil penelitian ini sesuai dengan Yang *et al.* (2000) bahwa aktivitas optimum protease *B. subtilis* Y-108 adalah pada suhu 50 °C dan pH 8.

KESIMPULAN

Strain A₁ dapat mendegradasi protein yang terdapat pada susu skim, dengan aktivitas enzim protease tertinggi didapat dengan waktu inkubasi tiga hari dengan substrat azokasein 0,1%, suhu 50°C, pH 8,5, diaktifkan oleh Ca⁺², Mn⁺² dan dihambat Cu⁺², Hg⁺² dan K⁺, Na⁺. Hasil identifikasi molekuler dengan sekuensing 16S rDNA dan analisis filogenetik berdasarkan metode *Neighbor Joining* strain A₁ adalah *B. subtilis* dan telah terdaftar di kultur koleksi InaCC dengan nomor B 398.

Untuk selanjutnya bahwa penelitian ini harus dilanjutkan dengan mengkarakterisasi biodeterjen dari *B. subtilis* A₁ dan dibandingkan dengan deterjen komersial dan lokal. Diharapkan enzim ini dapat dimanfaatkan secara komersial.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI), Depdiknas 2010. Terimakasih disampaikan kepada sdr Niwu Setianingrum atas asistensinya di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K, P Ellaiah and DS Prasad. 2003.** Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-1. *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Sciences Technology* **4(4)**, 440-448.
- Agarwal D, P Patidar, T Banerjee and S Patil. 2004.** Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. Under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry* **39**, 977-981.
- Agustien A, A Feskaharny dan R Yetria. 2007.** Optimasi produksi protease dari *Bacillus* sp. Psa-11 termoalkalifilik galur lokal dan aplikasinya untuk aditif deterjen. repository.unand.ac.id/1966/ . (Diunduh 5 Juli 2011).
- Agustini R. 2006.** The Utilization of Thermophilic Protease Which Life in Hot Spring Cangar Batu Malang. *Indonesia Journal Chemistry* **6(2)**, 205-211.
- Ahira A. 2011.** Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim <http://id.shvoong.com/exact-sciences/biology/2089443-faktor-yang-mempengaruhi-kerja-enzim/#ixzz1IkOI7S8K>. (Diunduh 20 Juni 2011).
- Akcan N. and F. Uyar. 2011.** Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. *Eurasia Journal of Biosciences* **5**, 64-72.
- Akhdiya A. 2003.** Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Buletin Plasma Nutfah* **9 (2)**, 38-44.
- Amara AA, RS Soheir and MSA Shabeb. 2009.** The Possibility to Use Bacterial Protease and Lipase as Biodetergent. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* **4(2)**, 104-114.
- Cappuccino JG and N Sherman. 1983.** *Mikrobiologi : A Laboratory Manual*. Addison- Wesley Publishing Company. California USA.
- Djamel C, T Ali and C Nelly. 2009.** Acid Protease Production by Isolated Species of *Penicillium*. *European Journal of Scientific Research* **25(3)**, 469-477.
- Efron B. 1979.** Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The annals of Statistics* **7(1)**, 1-26.
- Fuad AM, R Rahmawati dan NR Mubarik. 2004.** Produksi dan Karakterisasi Parsial Protease Alkali Termotabil *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01. *Journal Mikrobiologi Indonesia* **9(1)**, 29-35.
- Hmidet N, NEH Ali, A Haddar, S Kanoun, SK Alya and M Nasri. 2009.** Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal* **47**, 71-79.
- Jamilah I, A Meryandini, I Rusmana, A Suwanto and NR Mubarik. 2009.** Activity of Proteolytic and Amylolytic Enzymes from *Bacillus* spp. Isolated from Shrimp Ponds. *Journal Mikrobiologi Indonesia* **3(2)**, 67-71.
- Kamoun AS, A Haddar, NEH Ali, BG Frikha, S Kanoun and M Nasri. 2008.** Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research* **163**, 299-306.
- Kosim M. 2010.** Pengaruh Suhu Pada Protease Dari *Bacillus subtilis*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. [Skripsi].
- Mubarik NR. 2001.** Imobilisasi Protease *Bacillus subtilis* ATCC 6633 menggunakan Matriks Gel Poliakrilamida. *Journal Hayati* **8(1)**, 11-14.
- Nadeem M, JI Qazi, Q Syed and M Gulsher. 2013.** Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* UV-9 for detergent formulations. *Songklanakarin Journal Science Technology* **35(2)**, 187-195.
- Nagodawithana and Reed. 1993.** Di dalam Protease [lets-belajar.blogspot.com /2007/ 08/protease.html](http://lets-belajar.blogspot.com/2007/08/protease.html). (Diunduh 22 Juni 2011).
- Naiola E. dan N Widhyastuti. 2002.** Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Jurnal Berita Biologi* **6(3)**, 467- 473.
- Naiola E. dan N Widhyastuti. 2007.** Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* sp. *Berkala Penelitian Hayati* **13**, 51-56.
- Nascimento WCA , MLL Martins. 2006.** Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**, 307-311
- Nehra KS, S Dhillon, K Chaudhary and R Singh. 2002.** Production of alkaline protease by *Aspergillus* species under submerged and solid state fermentation. *Indian Journal Microbiology* **42**, 43-47.
- Nurkomalawati I. 2011.** Detergen Alami. healthrightinten.blogspot.com/.../kata-pengantar-syukurallah-dulillah-ke. (Diunduh 3 Januari 2014).
- Nurmalinda A, Periadnadi dan Nurmiati. 2013.** Isolasi dan

- Karakterisasi Parsial Bakteri Indigenous Pemfermentasi dari Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Jurnal Biologi Universitas Andalas* **2(1)**, 8-13.
- Pakpahan R. 2009.** Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara Medan. [Tesis].
- Palsaniya P, R Mishra, N Beejawat, S Sethi and BL Gupta. 2012.** Optimization of Alkaline Protease Production from Bacteria Isolated from Soil. *Journal Microbiology Biotechnology Research.* **2(6)**, 858-865.
- Purwadaria T., P.A. Marbun, A.P. Sinurat dan P.P. Ketaren. 2003.** Perbandingan Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri dan Kapang Hasil Isolasi dari Rayap. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner* **8(4)**, 213-219.
- Putranto WS. 2006.** Purifikasi dan Karakterisasi Protease Yang Dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam Fermentasi Susu Sapi Perah. *Seminar Nasional Bioteknologi* “ Capturing Opportunities through Biotechnology” Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI.
- Rahayu S, MT Suhartono dan W Suryapratama. 2013.** Formulasi larutan pencuci sarang burung walet berbasis enzim keratinase dan reduktase dari *Bacillus* sp. Mts. *insentif.ristek.go.id/petunjuk/BHN_2013/RT-2013-0970.doc.* (Diunduh 2 Januari 2014).
- Saitou N. and Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Siddalingeshwara KG, J Uday, CH Huchesh, HP Puttaraju, J Karthic, KM Sudipta, T Pramod and T Vishwanatha. 2010.** Screening And Characterization Of Protease From *Bacillus* Sp. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* **1(2)**, 575-581.
- Suhartono MT. 1995.** Bioteknologi enzim *protease*. Seri Agrotek **2(2)**, 4-10. www.biotek.lipi.go.id/perpus/index.php?p=show_detail... (Diunduh 20 Juni 2011).
- Susanti EVH. 2003.** Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Jurnal Biodiversitas* **4(1)**, 12-17.
- Tamura K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei and S Kumar. 2011.** MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.
- Timurtri BC, IN Fauziah dan M Kristin. 2009.** Aplikasi enzim Protease Dalam Formulasi Deterjen Cair Berbasis Metil Ester Sulfonat (MES) yang Ramah Lingkungan. Program Kreativitas Mahasiswa. Jurusan Teknologi Industri Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Yang SS and CI Huang 1994.** Proteases production by amylolytic fungi in solid state fermentation. *Journal of Chinese Agriculture and Chemical Society* **32(6)**, 589-601.
- Yang JK, IL Shih, YM Tzeng and SL Wang. 2000.** Abstract. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 406-413.
- Yuratmoko D, NR Mubarik and A Meryandini. 2007.** Screening of Proteolytic Enzymes of *Streptomyces* sp. Local Strain and Their Characterization. *Journal Microbiology Indonesia* **1(2)**, 69-73.