

PENAPISAN DAN KARAKTERISASI PROTEASE DARI BAKTERI TERMO-ASIDOFILIK P5-a DARI SUMBER AIR PANAS TAMBARANA

Dewi Seswita Zilda¹⁾, Atria Kusumarini²⁾, dan Ekowati Chasanah³⁾

ABSTRAK

Riset ini bertujuan untuk menapis dan mengisolasi bakteri penghasil protease dari sumber air panas Tambarana (Sulawesi Tengah) serta mengkarakterisasi enzim protease yang dihasilkan. Penapisan dilakukan menggunakan media padat yang dimodifikasi dengan komposisi 0,2% ekstrak kapang; 0,5% pepton; 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,1% NaCl; 2% agar dan 2% susu skim. Dua belas isolat bakteri yang diperoleh, semuanya mampu tumbuh pada media padat pH 5,5 dan suhu inkubasi 55°C dan memiliki potensi sebagai penghasil protease dengan indeks proteolitik (IP) 1,22–2,83. Isolat P5-a, merupakan isolat terbaik dengan nilai IP tertinggi yang digunakan untuk studi lebih lanjut. Kurva pertumbuhan, optimasi produksi, dan karakterisasi enzim kasar hasil pemekatan dengan ammonium sulfat telah dilakukan. Enzim protease P5-a (ekstrak kasar) bekerja optimal pada pH 6 dan suhu 50°C. Aktivitas enzim dipacu oleh adanya ion Ca^{2+} dan Fe^{2+} (sebagai garam klorida; 1mM), sedangkan Co^{2+} , Zn^{2+} , dan EDTA dalam konsentrasi yang sama menghambat aktivitas enzim tersebut. Enzim protease P5-a tahan terhadap deterjen (SDS 1%), Triton X-100 (5%), dan PMSF (1 dan 5 mM), menunjukkan bahwa enzim protease tersebut kemungkinan termasuk ke dalam protease logam.

ABSTRACT: *Screening and characterization of P5-a protease from thermo-acidophilic bacteria originated from Tambarana hot spring. By: Dewi Seswita Zilda, Atria Kusumarini and Ekowati Chasanah*

The aim of this research was to screen and isolate protease producing bacteria and characterize the enzyme produced. Protease-producing isolates were screened from Tambarana hot springs, Central Sulawesi. The screening was carried out using Modified Solid Medium containing 0.2% yeast extract, 0.5% peptone, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 2 % agar, and 2 % skim milk. Twelve isolates derived from these studies grew well at pH of 5.5 solid medium and high incubation temperature (55°C). All of them showed high potency as protease producer as shown by high proteolytic indexes (PIs) of 1.22 to 2.83. The best isolate was P5-a, which had the highest PI value, and subsequently used for further studies. Growth curve, optimization of production time and characterization of crude enzyme concentrated by ammonium sulfate have been conducted. The optimum activity of the enzyme was at pH 6 and temperature 50°C. Addition of Ca^{2+} and Fe^{2+} (as chloride salt; 1mM) accelerated the enzyme activity, while Co^{2+} , Zn^{2+} and EDTA decreased the activity. The activity of P5-a protease was not affected by Sodium dodecyl sulphate (SDS; 1%), Triton X-100 (5%) and and PMSF (1 and 5 mM), indicating that such protease might belong to metallo-protease.

KEYWORDS: *protease, characterization, Tambarana hot-spring water*

PENDAHULUAN

Pada beberapa tahun terakhir ini, banyak dilakukan eksplorasi terhadap pemanfaatan enzim untuk berbagai keperluan industri, di antaranya sebagai bahan obat-obatan, industri makanan, pakan, deterjen, dan lain-lain. Kemajuan yang pesat dalam teknologi DNA rekombinan, metoda *high throughput cultivation*, *genomic*, dan *proteomic* turut mendorong dalam pengembangan proses biokatalisis. Hal ini dapat dilihat dengan meningkatnya pemanfaatan enzim untuk berbagai industri, dari US\$1 juta pada tahun 1995 (Godfrey & West, 1996) menjadi US\$ 1,5 juta pada tahun 2000 (McCoy, 2000).

Protease merupakan salah satu enzim industri yang paling penting yang nilai komersialnya mencapai 60% dari total penjualan enzim seluruh dunia dan merupakan salah satu produk andalan dari enzim termofilik yang banyak dipakai pada industri pengolahan makanan dan detergen. Dalam pengolahan limbah perikanan, protease termofilik dapat diaplikasikan dalam pembersihan tulang dari sisa daging pada proses pembuatan gelatin. Aplikasi lain adalah dalam proses deproteinasi bahan baku industri kitosan, serta ekstraksi dan produksi konsentrat protein. Saat ini hampir seluruh kebutuhan enzim yang digunakan di Indonesia dipasok dari luar negeri. Oleh karena itu, pengembangan produksi

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP

²⁾ Mahasiswa Universitas Pancasila

enzim dalam negeri dirasakan sangat mendesak untuk mengurangi ketergantungan dari impor.

Riset ini merupakan bagian dari riset eksplorasi enzim potensial untuk industri dari lingkungan laut Indonesia. Pemilihan lokasi pengambilan sampel di sumber air panas Tambarana, Sulawesi Tengah, yang memiliki suhu relatif tinggi (50°C) dan tingkat keasaman rendah (pH 4,9) ditujukan untuk memperoleh enzim dengan sifat unik yaitu tidak mudah rusak pada suhu tinggi. Seperti yang dilaporkan oleh Van de Burg (2003), informasi mengenai protease termofilik dari lingkungan laut belum banyak terungkap. Oleh karena itu, hasil riset ini diharapkan juga akan memberikan sumbangan ilmiah terhadap potensi enzim termofilik dari Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi air yang diperoleh dari sumber air laut panas Tasiwinoni Tambarana, Poso, Sulawesi Tengah. Kondisi lingkungan ketika pengambilan sampel diukur seperti suhu, pH, dan salinitas. Sampel diambil secara aseptis, ditempatkan dalam botol plastik steril, kemudian dimasukkan ke dalam *cool box* yang sudah diisi es. Setelah sampai di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta, sampel segera dimasukkan ke *refrigerator* sebelum dianalisis lebih lanjut. Bahan kimia dan media mikrobiologi yang digunakan adalah yang bersifat *analytical grade*.

Persiapan Media

Penapisan bakteri termofilik (termofil) dilakukan menggunakan media padat *Thermus Modified Medium* (TMM) yang terdiri dari 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,1% NaCl, 0,35% $(NH_4)_2SO_4$; 0,05% ekstrak kapang, 0,05% pepton, dan 2% bacto agar.

Isolasi Bakteri

Sepuluh liter air disaring berturut-turut dengan membran nilon *millipore* berukuran 0,45- μm dan 0,22- μm . Membran yang mengandung sel mikroba disimpan dalam *buffer* TE (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA) pada -70°C. Suspensi sel kemudian disebar langsung pada media TMM padat pH 5,5 sesuai dengan pH di mana sampel air diambil. Koloni tunggal yang tumbuh diisolasi pada media padat baru. Inkubasi untuk mendapatkan termofil dilakukan pada suhu 55°C selama 1 hari. Sel yang sudah murni disimpan dalam 40% gliserol pada suhu -70°C.

Seleksi Termofil Penghasil Protease

Isolat murni ditumbuhkan dalam TMM padat yang mengandung 2% susu skim. Diameter koloni yang tumbuh dan zona bening yang terbentuk di sekeliling koloni diukur. Indeks Proteolitik (IP), yang merupakan parameter kemampuan isolat memproduksi protease, dihitung dari rasio diameter zona bening dan koloni bakteri (Ward, 1983). Isolat yang mempunyai IP tinggi diprediksi sebagai isolat yang potensial sebagai penghasil protease.

Kurva Pertumbuhan

Isolat terbaik ditumbuhkan pada media TMM cair pH 5,5 dan diinkubasi pada suhu 55°C. Pengambilan sampel dilakukan setiap 3 jam sampai jam ke 27. Sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.

Optimasi Produksi Enzim

Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan media cair TMM pH 5,5 dengan penambahan 2% susu skim. Satu ose isolat dimasukkan ke dalam 50 ml media starter dan diinkubasikan pada *shaker bath* bersuhu 55°C, 125 rpm selama 8 jam. Sebanyak 5% starter diinokulasikan ke dalam 100 mL media produksi cair dan diinkubasikan pada kondisi yang sama dengan starter. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke 0, 2, 4, 6, 10, 14, 20, 26, 32. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5.000 g selama 10 menit untuk memisahkan sel bakteri. Supernatan (enzim kasar) dipisahkan dan dianalisis.

Pemekatan Enzim

Enzim kasar dipekatkan menggunakan metoda *salting out* dengan amonium sulfat (Bollag & Edelstein, 1991). Optimasi dilakukan dengan menambahkan 30, 40, 50, 60, 70, dan 80% amonium sulfat secara perlahan dalam kondisi dingin. Sampel enzim yang telah ditambah amonium sulfat kemudian dibiarkan semalam pada suhu 4°C. Endapan berupa enzim yang telah dipekatkan dipisahkan melalui sentrifugasi pada 10.000 g selama 15 menit. Aktivitas enzim diukur pada endapan dan supernatan.

Pengukuran Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim diukur dengan menggunakan metode Bergmeyer & Grab (1984) dengan modifikasi. Sampel dibuat dengan mencampur 250 mL bufer sitrat 0,05M pH 6, 250 mL kasein 2% dan 50 mL larutan enzim, lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Sebanyak 500 mL TCA 10% dan 50 mL akuades ditambahkan ke dalamnya, lalu diinkubasi kembali pada suhu 60°C selama 10 menit. Campuran

tersebut kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C selama 10 menit dengan kecepatan 9.000 g. Supernatan dipisahkan, dan sebanyak 300 mL supernatan direaksikan dengan 1 mL natrium karbonat 0,5 M dan 200 mL pereaksi Folin, lalu diinkubasi kembali pada suhu 60°C selama 20 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 578 nm. Standar dibuat dengan menggunakan tirosin 5M 50 mL dengan cara yang sama seperti sampel. Blanko dibuat dengan menggunakan enzim inaktif dengan reaksi yang sama. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu mmol tirosin per menit pada kondisi pengukuran.

Penentuan Kadar Protein

Kadar protein dari enzim kasar diukur dengan menggunakan metode Lowry (Bollag & Edelstain, 1991).

Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim protease pada suhu 55°C dengan menggunakan satu seri bufer 0,05M : pH 4, 5, 6 dengan bufer sitrat; pH 6, 7, 8 dengan bufer fosfat dan pH 8, 9, 10 dengan bufer borat.

Pengukuran Suhu Optimum dan Ketahanan Panas

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada pH optimumnya dengan suhu inkubasi 30–80°C. Pengujian stabilitas enzim protease dilakukan dengan menginkubasi 3 mL larutan enzim (tanpa substrat) masing-masing pada suhu 50 dan 60°C selama 1 jam. Tiap 10 menit, 400 µL enzim tersebut diambil untuk diukur aktivitas enzimnya pada pH dan suhu optimumnya.

Pengaruh Inhibitor, Detergen, dan Ion Logam

Protease digolongkan berdasarkan senyawa penghambat (inhibitor) terhadap enzim. Senyawa penghambat yang digunakan adalah senyawa pengkelat ion logam, asam etilen diamintetraasetat (EDTA), dan penghambat spesifik protease serin, fenilmetilsulfoniifluorida (PMSF). Pengaruh detergen terhadap aktivitas enzim dilakukan menggunakan Triton-X 100 dan SDS dengan konsentrasi akhir 2,5 dan 5 %. Untuk mengetahui pengaruh ion logam, enzim direaksikan dengan kation divalen $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CuCl_2 , MgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 dan $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi akhir 1 dan 2 mM.

HASIL DAN BAHASAN

Penapisan dan Kurva Pertumbuhan

Kondisi lingkungan tempat pengambilan sampel dalam penelitian ini merupakan lingkungan yang unik dengan suhu air 50°C dan salinitas yang relatif tinggi yaitu 20‰ walaupun lokasinya terletak 2 km dari laut terbuka yaitu di sumber air panas Tasiwinoni, Tambarana Poso, Sulawesi Utara. Keunikan lainnya adalah pH air yang rendah (4,9) dan dikelilingi oleh hutan mangrove. Dari percobaan ini didapatkan 12 isolat penghasil protease, yang mayoritas adalah gram negatif, berbentuk diplobasillus dan tidak membentuk spora (Tabel 1).

Isolat P5-a yang merupakan isolat dengan IP tertinggi (2,83), adalah bakteri gram negatif dan tidak membentuk spora. Dari kurva pertumbuhan isolat tersebut, isolat P5-a memiliki fase lag yang cepat, yakni dari jam ke-0 sampai jam ke-3 inkubasi (Gambar 1). Fase lag atau fase adaptasi merupakan keadaan

Tabel 1. Indeks proteolitik isolat dari sampel air panas Tasiwinoni, Tambarana, Sulawesi Tengah
 Table 1. *Proteolytic index of bacterial isolates from hot spring of Tasiwinoni, Tambarana, Central Sulawesi*

No	Kode Isolat/Isolate code	Indeks proteolitik/Proteolytic index
1	P3-a	1.22
2	P3-b	1.78
3	P3-c	1.76
4	P3-d	1.66
5	P3-e	2.40
6	P3-f	2.22
7	P3-g	2.50
8	P4-a	2.57
9	P5-a	2.83
10	P5-b	1.45
11	P5-c	1.42
12	P7-2	1.33

di mana sel-sel mikroba yang kekurangan nutrisi pada kultur sebelumnya mulai menyesuaikan diri dengan lingkungannya yang baru (Mahfud *et al.*, 1989; Jawetz, 1995).

Isolat ini memiliki fase log yang cukup lama, yakni dari jam ke-6 sampai jam ke-15 inkubasi. Fase log adalah fase aktif sel di mana terjadi penambahan jumlah sel yang berlangsung terus menerus sampai terjadi fase stasioner, yakni fase di mana habisnya nutrisi atau terakumulasinya metabolit beracun dalam perbenihan (Machfud *et al.*, 1989; Jawetz, 1995). Pada fase ini mulai diproduksi enzim dan metabolit-metabolit lain. Fase stasioner isolat P5-a mulai terjadi pada jam ke-18 yang ditandai dengan nilai absorbansi sebagai parameter kekeruhan sel yang relatif konstan. Pada fase ini, laju pertumbuhan sebanding dengan laju kematian sel. Hal tersebut dikarenakan dengan bertambahnya jumlah sel maka jumlah nutrisi dalam media kultur akan berkurang sehingga terjadi kompetisi antar sel untuk memperebutkan nutrisi (Jawetz, 1995).

Optimasi Produksi

Optimasi produksi dilakukan untuk mengetahui waktu yang diperlukan untuk mendapatkan enzim dengan aktivitas yang tinggi. Dari hasil percobaan dapat diketahui bahwa waktu optimum produksi enzim oleh isolat P5-a adalah pada jam ke-21 dengan aktivitas sebesar 0,0183 U/mL. Dari Gambar 1 terlihat bahwa sampai jam ke-9 inkubasi, aktivitas enzim hampir tidak terdeteksi tetapi meningkat dengan cepat pada jam ke-12 sampai dengan jam ke-21, pada akhir fase logaritma. Aktivitas enzim kemudian menurun pada jam ke-24. *Bacillus subtilis* PE-11 menghasilkan

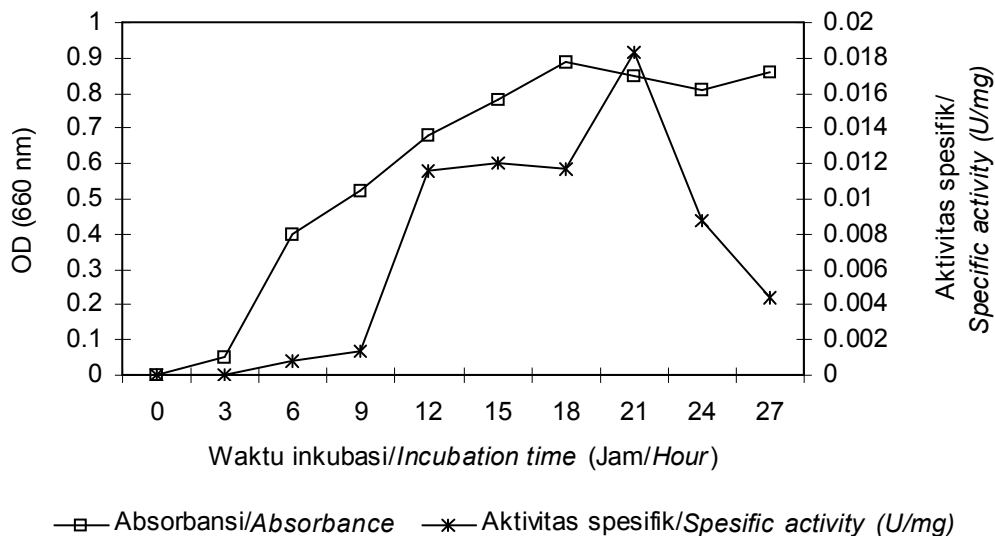
protease dengan waktu optimum produksi pada jam ke-48 (Adinarayana *et al.*, 2003), sementara isolat bakteri termofilik GP-04 pada jam ke-16 (Mubarik, 2001).

Pemekatan Enzim

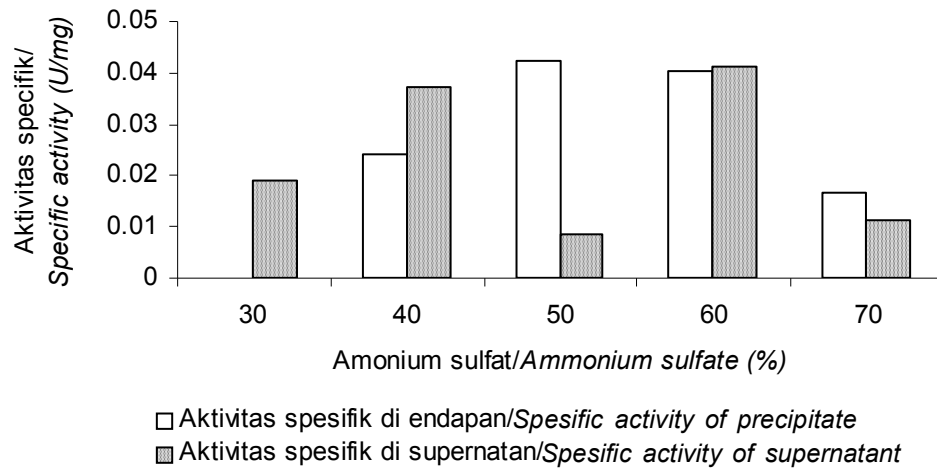
Enzim yang digunakan dalam percobaan ini adalah enzim yang diproduksi dari hasil inkubasi kultur selama 21 jam sesuai dengan hasil kegiatan sebelumnya. Dari percobaan optimasi didapatkan kondisi optimum untuk mengendapkan protease dengan aktivitas maksimal adalah konsentrasi amonium sulfat 50% (Gambar 2). Dalam larutan yang mengandung konsentrasi garam tinggi, jumlah molekul air dalam larutan akan berkurang sehingga molekul garam yang masih bebas akan menarik air yang berikatan dengan gugus non polar protein enzim. Hal tersebut menyebabkan terbukanya struktur protein sehingga gugus-gugus nonpolar protein akan berkumpul dan mengendap, akibatnya terjadi penurunan kelarutan protein dalam larutan (Scopes, 1988). Amonium sulfat digunakan dalam kegiatan ini karena sifatnya yang sangat mudah larut, mengendapkan protein dengan efektif, dapat digunakan pada berbagai pH dan suhu, serta harganya murah (Scopes, 1988).

Optimasi pH

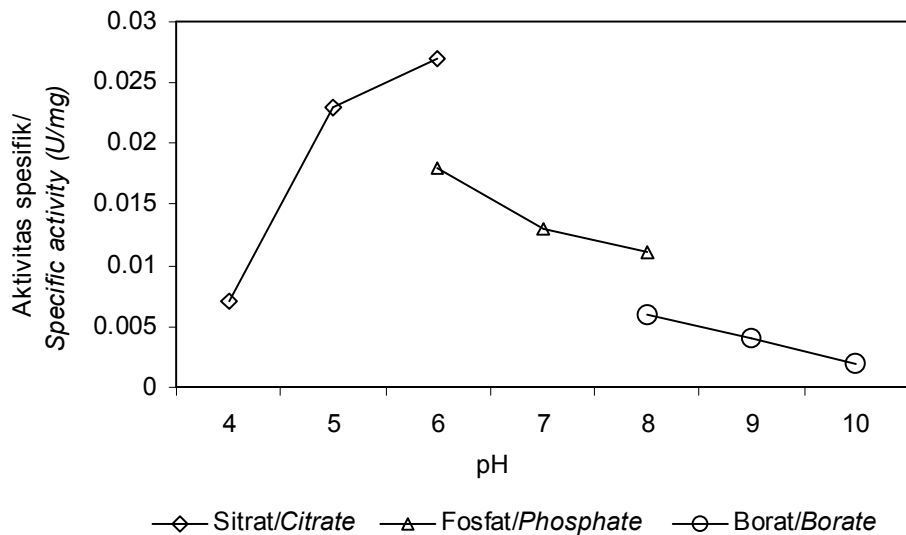
Pada percobaan ini digunakan 3 jenis bufer yaitu bufer sitrat 0,05 M (pH 4, 5, dan 6), bufer fosfat 0,05 M (pH 6, 7, dan 8) dan bufer borat 0,05 M (pH 8, 9, dan 10) (Gambar 3). Dari percobaan ini diketahui bahwa enzim protease yang dihasilkan isolat P5-a bekerja sangat baik pada pH 6. Protease lain



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat P5-a dan aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan.
 Figure 1. Growth curve of P5-a isolate and specific activity of enzyme produced.



Gambar 2. Pengaruh penambahan amonium sulfat terhadap aktivitas spesifik protease P5-a.
 Figure 2. Effect of ammonium sulfate on specific activity of P5-a protease.



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik protease P5-a.
 Figure 3. Effect of pH on specific activity of P5-a protease.

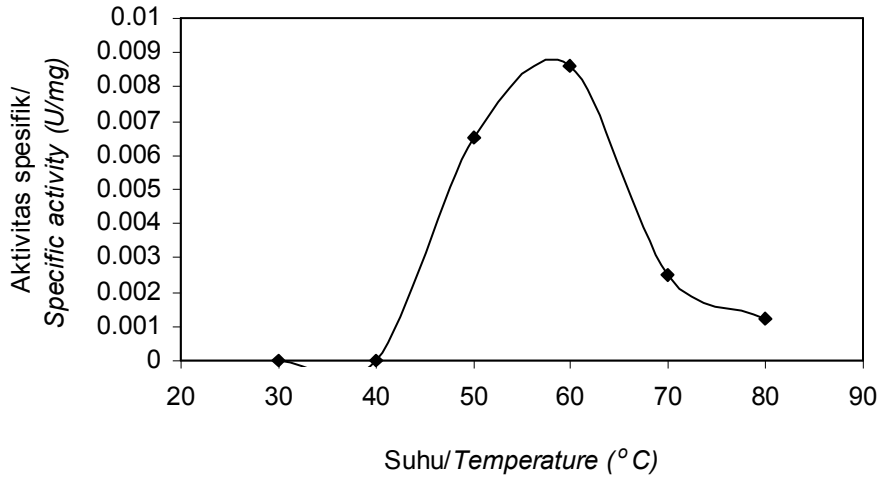
yang memiliki aktivitas optimum pada kisaran pH asam sampai netral antara lain berasal dari isolat P7-2 (Chasanah *et al.*, 2006) dan isolat TPS2d dengan pH optimum 7 (Wahyuntari, 2001), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 dengan pH optimum 5 (Croux *et al.*, 1990), serta dari *Bacillus* sp. dengan pH optimum 6 (Nascimento & Martins, 2004).

Optimasi Suhu dan Ketahanan Terhadap Suhu Tinggi

Pada percobaan ini enzim diinkubasi tanpa substrat pada suhu 30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C kemudian diukur aktivitasnya menggunakan buffer sitrat pH 6. Dari percobaan ini diketahui suhu optimum protease yang dihasilkan oleh P5-a adalah

60°C yang memberikan aktivitas tertinggi. Aktivitas enzim tidak terdeteksi pada inkubasi suhu 30 dan 40°C, dan aktivitas yang cukup tinggi didapat pada inkubasi suhu 50°C (Gambar 4). Hasil yang hampir sama juga ditemukan oleh Dhandapani & Vijayaragavan (1994) pada protease yang dihasilkan oleh *B. stearothermophilus* AP-4 dengan suhu optimum 55°C dan protease yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. B21-2 pada suhu 60°C (Fujiwara & Yamamoto, 1987).

Dari uji ketahanan terhadap suhu diketahui bahwa protease yang dihasilkan oleh P5-a lebih stabil pada suhu 50°C di mana setelah 50 menit inkubasi aktivitas enzim masih tersisa 71% (Gambar 5.). Protease yang dihasilkan ini memiliki ketahanan suhu yang lebih



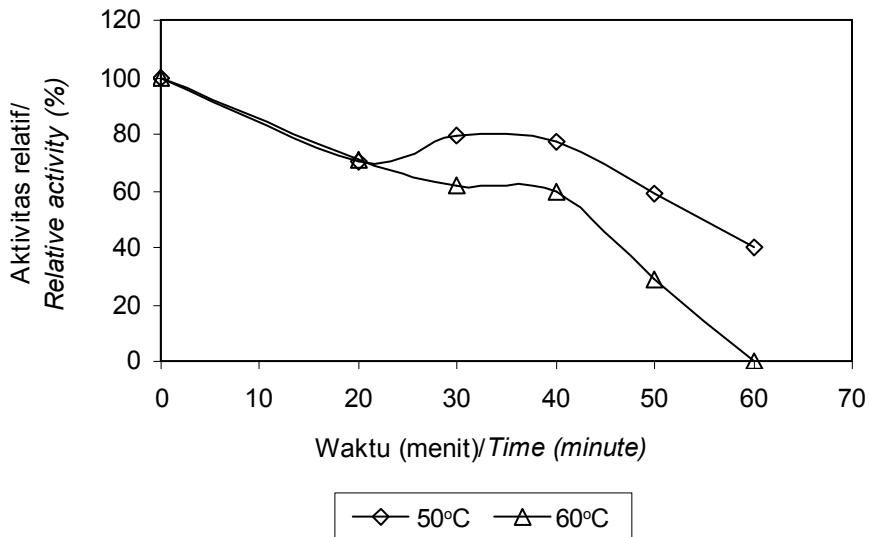
Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas spesifik protease P5-a.
 Figure 4. Effect of temperature on specific activity of P5-a protease.

rendah dibanding protease yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus* yang mempunyai suhu optimum 50°C, tetapi menunjukkan kestabilan pada suhu 75° dengan aktivitas 95% setelah 40 menit (Sidler *et al.* 1986). Protease dari *Bacillus thermoruber* yang mempunyai suhu optimum 45°C stabil pada suhu 60°C dengan aktivitas relatif 100% setelah 60 menit inkubasi (Jewell, 2000). Protease dari *Bacillus clausii* I-52 dengan maksimum aktivitas pada suhu antara 60–65°C dilaporkan stabil sampai suhu 55°C selama 1 jam inkubasi.

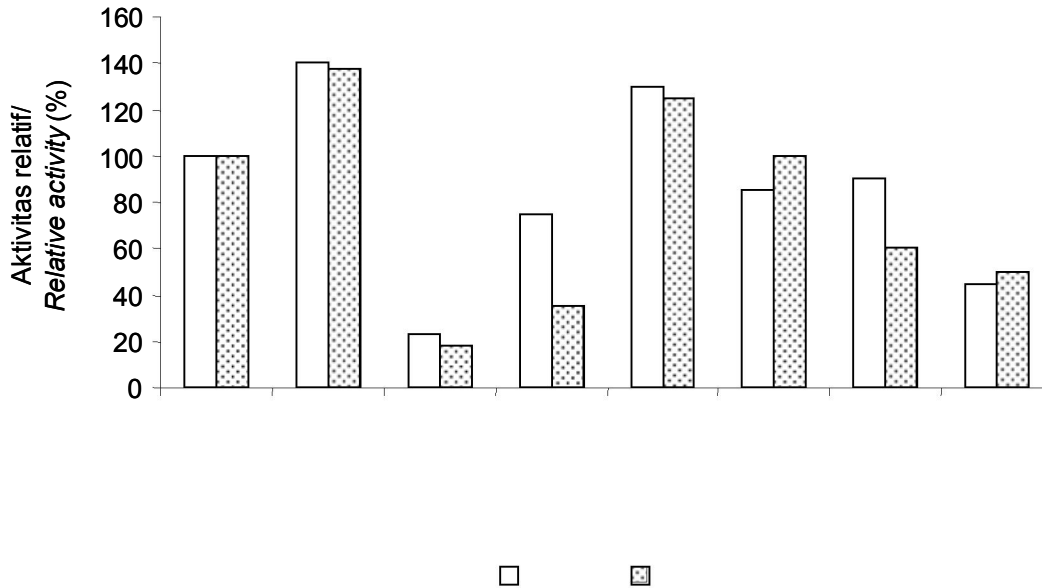
Pengaruh Penambahan Ion Logam dan Detergen

Pada kegiatan ini digunakan 2 konsentrasi ion logam dalam bentuk garam klorida yaitu 1 dan 5 mM.

Dari hasil kegiatan diketahui bahwa penambahan ion Ca^{2+} dan Fe^{2+} baik 1mM maupun 5mM mampu meningkatkan aktivitas enzim, sementara pada penambahan ion Co^{2+} dan Cu^{2+} dengan konsentrasi 5 mM, aktivitas enzim yang tersisa hanya 33 dan 17% (Gambar 6). Beberapa laporan menunjukkan bahwa penambahan ion Ca^{2+} mampu meningkatkan ketahanan terhadap panas, seperti protease yang dihasilkan oleh *Bacillus thermobacter* yang mampu mempertahankan aktivitasnya pada suhu 60°C selama 60 menit dengan penambahan 2 mM $CaCl_2$ (Manachini *et al.*, 1988). Demikian juga dengan beberapa protease lain seperti yang dihasilkan oleh *Bacillus stearothermophilus* dengan penambahan 10 mM $CaCl_2$, sementara tanpa penambahan $CaCl_2$, aktivitasnya hanya 7%.



Gambar 5. Pengaruh panas terhadap aktivitas relatif protease P5-a.
 Figure 5. Effect of heat on relative activity of P5-a protease.



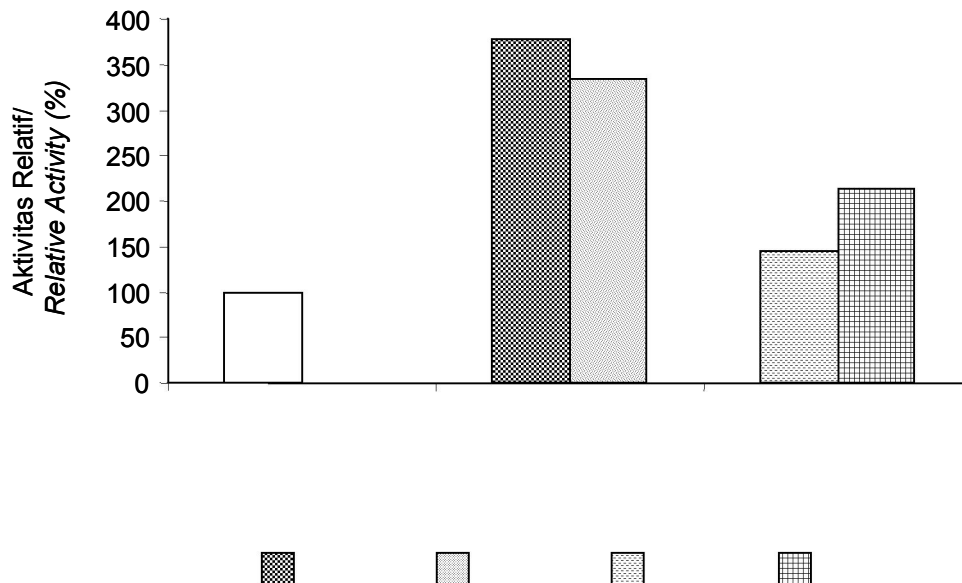
Gambar 6. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas relatif protease dari P5-a.
 Figure 6. Effect of metal ion on relative activity of P5-a protease.

Dari Gambar 7 terlihat bahwa penambahan Triton X-100 (2,5 dan 5%) tidak mempengaruhi aktivitas relatif enzim protease dari isolat P 5a, bahkan mampu meningkatkan. Karena itu, Triton X-100 yang merupakan detergen nonionik biasanya digunakan untuk mengembalikan struktur protein pada analisis zymogram. Penambahan SDS (0,1 dan 1%), yang merupakan detergen ionik, juga tidak memiliki efek negatif pada aktivitas enzim protease. Protease yang diketahui tahan terhadap pengaruh SDS diproduksi

oleh *Pseudomonas aeruginosa* PD100 (Najafi et al., 2005), isolat GP-04 (Mubarik, 2001) dan *Bacillus clausii* I-52 (Joo et al., 2003).

Penggolongan Protease P5-a

Salah satu parameter yang digunakan untuk mengklasifikasi protease adalah tingkat ketahanannya terhadap inhibitor seperti PMSF dan EDTA. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa protease yang dihasilkan oleh P5-a tahan terhadap PMSF, tetapi



Gambar 7. Pengaruh detergen terhadap aktivitas relatif protease dari P5-a.
 Figure 7. Effect of detergent on relative activity of P5-a protease.

menunjukkan penurunan aktivitas secara drastis ketika ditambahkan EDTA (Gambar 8). Hal ini mengindikasikan bahwa protease dari P5-a ini kemungkinan besar termasuk golongan protease logam.

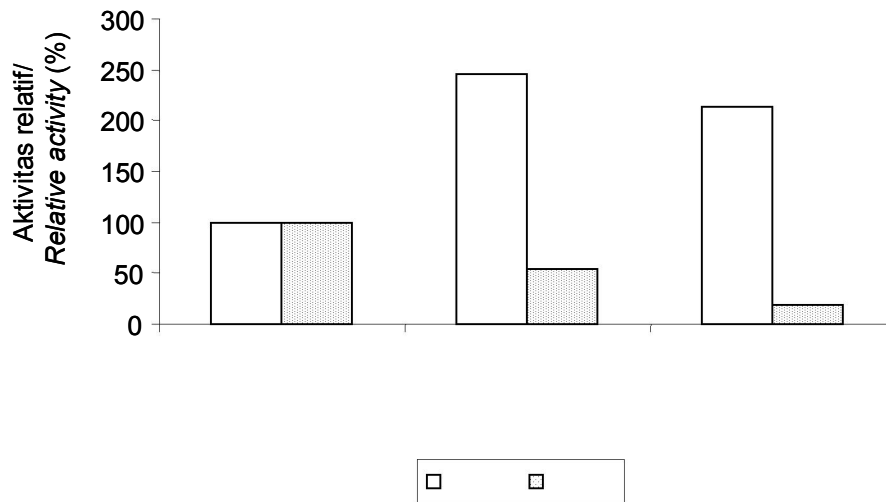
KESIMPULAN DAN SARAN

Di antara 12 isolat bakteri penghasil protease yang diisolasi dari sampel air panas Tasiwinoni, Tambarana, Sulawesi Tengah, isolat paling berpotensi sebagai sumber protease yaitu isolat P5-a. Pada kondisi optimum pertumbuhannya, yakni pH 5,5 dan suhu 55°C, isolat P5-a dapat memproduksi enzim protease dalam media TMM cair yang mengandung *skim milk* 2 % dengan lama waktu inkubasi optimum 21 jam. Enzim protease ini memiliki aktivitas optimum pada pH 6 dan suhu 60°C, serta stabil pada kondisi tersebut selama 30 menit. Enzim tersebut relatif stabil pada suhu 50°C, tahan terhadap SDS 0,1–1% dan Triton X-100 2,5–5%. Aktivitasnya dapat ditingkatkan dengan penambahan ion logam Ca^{2+} dan Fe^{2+} , tetapi turun oleh adanya ion logam Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , dan

kasar untuk keperluan pangan sangat diperlukan dan tambahan informasi tentang karakteristik enzim murni diperlukan untuk mengetahui potensi aplikasi enzim ini dalam bidang bioteknologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., and Prasad, D.S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm Sci Tech.* 4(4): 1–6.
- Bergmeyer, J. and Grab, M. 1984. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Vol V. Enzymes 3: Peptidases, proteinases, and their inhibitors. Weinheim: Verlag Chemie. p. 270–276.
- Bollag, DM. and Edelstein, SJ. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc.
- Chasanah, E., Sugiyono, Zilda, D.S., Yogiara, Uria, A.R., Munifah, I., dan Retnoningrum, D.S. 2006. Karakterisasi enzim protease dari bakteri termofilik asal sumber air panas Tambarana, Sulawesi Tengah. *Dalam: Isolasi dan karakterisasi enzim potensial asal mikroba laut. Laporan Teknis*. Balai



Gambar 8. Pengaruh penghambat terhadap aktivitas relatif protease dari P5-a.
 Figure 8. Effect of inhibitor on relative activity of P5-a protease.

Zn^{2+} , serta EDTA 1–5 mM. Dari hasil pengujian enzim protease P5-a dengan PMSF dapat diduga bahwa enzim ini termasuk dalam golongan protease logam.

Pada aplikasi ke depan enzim ini diperkirakan dapat digunakan sebagai bahan bantu pada proses pengolahan produk perikanan seperti pada industri penyamakan kulit ikan, produksi gelatin, serta pengolahan produk perikanan dan non perikanan lain yang memerlukan suhu sekitar 50°C. Sifat enzim ini yang relatif tahan terhadap bahan tambahan seperti detergen dan beberapa ion logam akan memudahkan dalam penanganannya. Uji aplikasi lebih lanjut enzim

Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta. p. 13–20.

- Croux, C., Paquet, V., Goma, G., and Soucaille, P. 1990. Purification and characterization of acidolysin, an acidic metalloprotease produced by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(12): 3634–42.

- Dhandapani, R and Vijayaragavan, R. 1994. Production of thermophilic extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *World J. Microbiol Biotechnol.* 10: 33–35.

- Fujiwara, N. and Yamamoto, K. 1987. Decomposition of gelatin layers on x-ray film by the alkaline protease of *Bacillus* sp. B21. *J. Ferment. Technol.* 65: 531–534.

- Jawetz, Melnick, Adelberg. 1995. *Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 20*. Diterjemahkan oleh Nugroho E, Maulany RF. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. p. 50–1.
- Jewell, S.N. 2000. *Purification and Characterization of a Novel Protease from Burkholderia Strain 2.2 N*. Thesis. The Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Joo, HS., Kumar, CG., Park, GC., Paik, SR., and Chang, CS. 2003. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and some properties. *J. Appl. Microbiol.* 95: 267–72.
- Machfud, Said, E.G., dan Krisnani. 1989. *Fermentor*. PAU Institut Pertanian Bogor, Bogor. p. 10-25.
- Manochini, P.L., Fortina, M.G., and Parini, C. 1988. Thermostable alkaline protease produced by *B. thermoruber* - a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 409–413.
- McCoy, M. 2000. Novozymes emerges. *Chem Eng News* 2000. 19: 23–25.
- Mubarik, N.R. 2001. *Pemurnian dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Termofilik GP-04*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor
- Najafi, M.F., Deobagkar, D., and Deobagkar, D. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Elect J Biotechnol.* 8(2): 1–5.
- Nascimento, W.C.A. and Martins, M.L.L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol.* 35: 1–2.
- Odfrey, T. and West, S. 1996. Introduction to industrial enzymology. In Godfrey, T. and West, S. (eds.). *Industrial Enzymology*, edn 2., London: Macmillan Press. p. 1–8.
- Scopes, R.K. 1988. *Protein Purification: Principles and Practice*. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 40–71, 302–6.
- Sidler, W., Kumpf, B., Petrhans, B., and Zuber, H. 1986. A neutral proteinase produced by *B. cereus* with high sequence homology to thermolysin: production, isolation and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 18–24.
- Van de Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology.* 6: 213–218.
- Wahyuntari, B. 2001. *Pemurnian dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler Isolat Prokariot Termofilik Ekstrim dari Tangkuban Perahu*. Dalam: Ringkasan Disertasi Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor. p. 26–34.
- Ward, O.P. 1983. Proteinase. In W.M. Fogarty (ed.). *Microbial Enzyme and Biotechnology*. Applied Science Publisher, New York.