

KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE DARI BAKTERI *Klebsiella sp.* INDIGEN TANAH TERCEMAR MINYAK DI BANDAR LAMPUNG

Dian Herasari^{1*}, Arifa Rahmatika Salsabilla¹, Indah Parwathi¹, Aspita Laila¹, Mulyono¹, dan
Suharso¹

¹Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung
Jl. Soemantri Brojonegoro No. 1, Bandar Lampung, 35141, Indonesia

email korespondensi : dian.herasari@fmipa.unila.ac.id

Diterima
30.03.2022

Direvisi
13.04.2022

Dipublikasikan
21.04.2022

© Penulis 2022

PISSN 2540-8224
EISSN 2540-8267



Penerbit:
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung

ABSTRAK

Enzim protease merupakan kelompok enzim hidrolase yang menghidrolisis ikatan peptida menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim protease yang banyak dimanfaatkan adalah yang berasal dari bakteri. Penelitian ini melakukan penentuan kondisi optimum pertumbuhan bakteri, produksi, pemurnian dan karakterisasi pH, suhu, waktu inkubasi, pengaruh ion logam dan senyawa EDTA terhadap aktivitas enzim. Penentuan data kinetika dan termodinamika meliputi K_M dan V_{maks} pada substrat kasein. Biakan bakteri yang ditumbuhkan pada kondisi optimum menunjukkan fase stasioner pertumbuhan tercapai pada waktu inkubasi 42 jam dengan aktivitas enzim sebesar 0,719 U/mL. Tahapan pemurnian enzim menghasilkan enzim dengan aktivitas berturut-turut sebesar 0,3894; 0,3621; dan 0,2259 U/mL. Karakterisasi enzim hasil pemurnian menunjukkan kondisi optimum aktivitas enzim pada pH 7, suhu 50 °C, dan waktu inkubasi 40 menit. Ion logam Na^+ dan Ca^{2+} meningkatkan aktivitas protease, sedangkan ion Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} menurunkan aktivitas protease. Nilai V_{maks} 0,6 μ mol/mL menit sedangkan nilai K_M sebesar 6,1 mg/mL substrat.

Kata kunci: : ion logam, kinetika, *Klebsiella sp.*, protease..

ABSTRACT

Protease enzymes are a group of hydrolase enzymes that hydrolyze peptide bonds into oligopeptides and amino acids. The protease enzymes that are widely used are those derived from bacteria. This study determined the optimum conditions for bacterial growth, production, purification and characterization of pH, temperature, incubation time, the effect of metal ions and EDTA compounds on enzyme activity. Determination of kinetic and thermodynamic data included K_M and V_{max} on casein substrates. Bacterial cultures grown under optimum conditions showed that the stationary phase of growth was reached at 42 hours of incubation with an enzyme activity of 0.719 U/mL. Enzyme purification steps produce enzymes with successive activities of 0.3894; 0.3621; and 0.2259 U/mL. The characterization of the purified enzymes showed the optimum conditions for enzyme activity at pH 7, temperature 50 °C, and incubation time of 40 minutes. Metal ions Na^+ and Ca^{2+} increased protease activity, while Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ions decreased protease activity. The V_{max} value was 0.6 mol/mL min while the K_M value was 6.1 mg/mL substrate.

Keywords: metal ions, kinetics, *Klebsiella sp.*, proteases.

PENDAHULUAN

Seiring berjalannya waktu, perkembangan industri enzim sudah semakin pesat dan menempati posisi penting dalam industri. Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta inisiatif dari para ahli menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam berbagai bidang industri (Kamelia dkk., 2005). Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam berbagai produk komersial adalah enzim protease ekstraseluler yang berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida besar.

Enzim protease dapat diisolasi dari berbagai sumber antara lain tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Mikroorganisme ialah organisme yang paling banyak digunakan sebagai sumber enzim dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Pemanfaatan mikroorganisme untuk produksi enzim protease lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada berbagai macam substrat sehingga lebih mudah diproduksi dalam skala besar dengan mengulas kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta produksinya yang ekstrim (Kosim dan Putra, 2009).

Salah satu sumber mikroba penghasil enzim adalah dari tanah tercemar. Tanah merupakan bagian terluar dari kerak bumi yang terdiri atas tiga fase, yaitu fase padatan, cairan, dan gas. Tanah yang tercemar dapat mengubah tatanan tanah alami dengan berubahnya sifat dasar tanah. Hal ini dapat disebabkan oleh tumpahan atau ceceran dari berbagai kegiatan, seperti kegiatan industri perminyakan, tumpahan solar pada proses pengisian bahan bakar transportasi, tumpahan oli pada kendaraan selain itu, pada usaha rumah makan, katering, serta kaki lima yang kemudian meresap ke dalam tanah. Menurut Toccalino (1993), Bakteri tanah yang tercemar dapat mendegradasi hidrokarbon karena kemampuannya yang dapat mengurai dan mengoksidasi hidrokarbon serta menjadikan hidrokarbon sebagai salah satu donor elektronnya.

Penelitian ini sangat penting dilakukan, karena dapat menjadi dasar acuan bagi proses industri enzim dan bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum enzim protease dari bakteri asal tanah. Penentuan kondisi optimum aktivitas enzim protease meliputi: suhu, pH dan waktu inkubasi serta karakterisasinya pada pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim, menentukan senyawa spesifik yang menghambat aktivitas enzim dan menentukan data kinetika serta termodinamika enzim protease.

METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah gelas kimia, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, pipet tetes, *autoclave* S-90N, inkubator, *Laminar Air Flow* CURMA model 9005-FL, *aluminium foil*, kertas penutup, gelas ukur, labu ukur, mikropipet Eppendorf, kantung selofan, plastik wrap, water bath, dan spektrofotometer Uv-Vis. Bahan-bahan yang digunakan adalah Nutrient Agar (NA), susu skim, kasein, aquades, tirosin, Bovine Serum Albumin (BSA), amonium sulfat, reagen folin ciocalteu, NaK-tartarat, NaOH, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, buffer fosfat, TCA, Na_2CO_3 , gel *Sephadex* G-75, CaCl_2 , MnCl_2 , NaCl, CuCl_2 , ZnCl_2 , HgCl_2 , Na_2EDTA .

Prosedur

Isolasi Bakteri Proteolitik dari Tanah

Pengambilan sampel tanah tercemar sisa olahan pangan dilakukan di lingkungan penjual nasi goreng di Kampung Baru, Kedaton, Bandar Lampung. Sebanyak 1 gram tanah dilarutkan dalam aquades, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-6} . Diambil 1 mL hasil pengenceran dan diinokulasikan dalam media *Skim Milk Agar* (SMA) dengan metode *spread plate* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada cawan petri kemudian dilakukan pemurnian pada media yang sama dengan metode gores (*streak plate*). Seleksi bakteri dilakukan berdasarkan uji kualitatif proteolitik.

Identifikasi Bakteri Proteolitik

Isolat bakteri yang berhasil diisolasi dan memiliki aktivitas proteolitik kemudian diinokulasi pada media agar miring dan bakteri diidentifikasi dengan mengirim isolat bakteri ke Laboratorium uji Bakteriologi Balai Veteriner Lampung.

Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri

Parameter untuk mengetahui kondisi optimum pertumbuhan bakteri *Klebsiella* sp, yaitu variasi waktu inkubasi dan pH. dengan waktu inkubasi selama 72 jam dan variasi pH 6,7, dan 8.

Produksi Enzim

Setelah diketahui kondisi optimum produksi enzim, dilakukan produksi enzim dalam jumlah volume besar sekitar 1000 mL. Media produksi atau fermentasi selanjutnya, diinkubasi selama

kondisi produksi optimum. Kemudian media fermentasi disentrifugasi selama 30 menit. Supernatan diambil, dilakukan uji aktivitas protease dan uji kadar protein.

Pemurnian Enzim Protease

a. Fraksinasi Amonium Sulfat

Ekstrak enzim kasar yang diperoleh selanjutnya, diendapkan dengan fraksinasi amonium sulfat dengan berbagai konsentrasi, yaitu 0-20 %; sampai 80-100 %. Ekstrak enzim kasar diukur volumenya, ditambah amonium sulfat sampai konsentrasi akhir jenuh, dan disentrifugasi. Supernatan ditampung, dan endapan yang tertinggal dibilas dengan buffer lalu disimpan pada suhu 4 °C sebagai fraksi endapan. Fraksi-fraksi endapan tersebut kemudian diuji aktivitas dan didialisis.

b. Dialisis

Fraksi enzim hasil fraksinasi tertinggi dimurnikan dengan cara dialisis melalui kantung selofan. Fraksi dimasukkan kedalam kantong selofan dan didialisis menggunakan buffer fosfat pH 7 selama 24 jam pada suhu dingin. Dilakukan pergantian buffer selama 4-6 jam. Fraksi hasil dialisis diuji aktivitas dan kadar protein dan fraksi dengan aktivitas tertinggi dilakukan pemurnian kromatografi filtrasi gel.

c. Kromatografi Filtrasi Gel

Fraksi hasil dialisis yang memiliki aktivitas tertinggi dimurnikan dengan metode penyaring molekul (Filtrasi gel) menggunakan kolom dan gel Sephadex G-75 dalam ruang dingin. Larutan yang digunakan sebagai eluen adalah bufer fosfat pH 7. Eluet ditampung setiap 5 ml sampai diperoleh 30 tabung eluet.

Karakterisasi Enzim Protease

Uji karakterisasi enzim protease meliputi kondisi optimum, yaitu pengaruh pH (6, 7, dan 8), dilakukan menggunakan buffer fosfat 0,05 M, suhu (35, 40, 45, 50, 55, dan 60 °C dan waktu inkubasi (20, 30, 40, 50, dan 60 menit). Penentuan terhadap aktivitas enzim diuji dengan metode kunitz.

Pengaruh EDTA dan HgCl₂

Senyawa EDTA dan logam HgCl_2 konsentrasi 5 mM . Uji pengaruh senyawa EDTA dan logam HgCl_2 dilakukan dengan mereaksikan larutan enzim dengan substrat dan senyawa tersebut dalam kondisi optimum. kemudian diuji aktivitas enzim dan dibandingkan dengan aktivitas enzim tanpa penambahan senyawa EDTA dan logam HgCl_2 (Wahyuntari dan Hendrawati, 2012).

Pengaruh Ion Logam

Ion logam Ca^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} dalam bentuk garam dari masing masing CaCl_2 , MnCl_2 , NaCl , CuCl_2 , ZnCl_2 dengan konsentrasi 5 mM. Uji pengaruh ion logam dengan mereaksikan larutan enzim dengan substrat dan ion logam tersebut dalam kondisi optimum. Larutan tersebut diuji aktivitas enzimnya dan dibandingkan dengan enzim tanpa penambahan logam (Wahyuntari dan Hendrawati, 2012).

Penentuan Kinetika Enzim (K_M dan V_{maks})

Nilai Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim hasil pemurnian dapat ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat yang digunakan, yaitu 0,5; 0,75; 1; 1,25; dan 1,5 %. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim. Data yang diperoleh diplotkan dalam kurva Lineweaver-Burk untuk mendapatkan nilai K_M dan V_{maks} .

Termodinamika Stabilitas Enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama periode waktu 60 menit pada suhu dan pH optimum dengan mengukur aktivitas enzim setelah proses pemanasan setelah interval waktu 10 menit. Aktivitas awal enzim (tanpa proses) diberi nilai 100% (Yang *et al.*, 1996).

Penentuan waktu paruh ($t_{1/2}$), konstanta laju inaktivasi (k_i), dan perubahan energi akibat denaturasi (ΔG_i): perubahan nilai k_i (konstanta laju inaktivasi) enzim protease hasil pemurnian dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997).

Uji Aktivitas Protease dengan Metode Kunitz

Larutan kasein 1 mL dan larutan enzim 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 35 °C selama 30 menit kemudian ditambahkan 3 mL TCA 5% secara tepat, diaduk dan diamkan lebih kurang 30 menit pada suhu ruang agar

pengendapan sempurna. Endapan yang terbentuk di sentrifugasi. Filtrat diukur dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 280 nm.

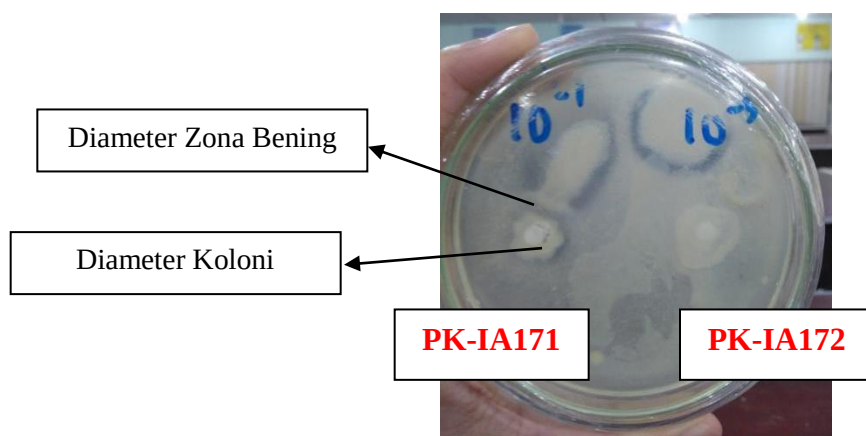
Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Sampel enzim sebanyak 0,1 mL ditambahkan 0,9 mL aquades ditambahkan 5 mL pereaksi Lowry C lalu dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Tambahkan pereaksi Lowry D (*folin ciocalteu*) sebanyak 0,5 mL lalu dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Lalu ditentukan absorbansi spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Proteolitik

Potensi bakteri dalam menghasilkan enzim protease ekstraseluler secara kualitatif dapat diketahui berdasarkan ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri pada media *Skim Milk Agar*. Aktivitas protease pada media SMA diukur menggunakan indeks protease (IP) yakni dengan membandingkan antara diameter zona bening di sekitar koloni dengan diameter koloni bakteri (Soeka dan Sulistiani, 2014). Hasil pengamatan zona bening yang diuji pada media SMA dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji kualitatif zona bening

Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa isolat PK-IA171 memiliki diameter koloni bakteri sebesar 24,5 mm dan diameter zona bening sebesar 35,95 mm dengan indeks proteolitik sebesar 1,46. Pada isolat PK-IA172 memiliki diameter koloni bakteri sebesar 10,95 mm dan diameter

zona bening sebesar 15,51 dengan indeks proteolitik sebesar 1,41. Isolat bakteri PK-IA171 memiliki nilai IP yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat bakteri PK-IA172, sehingga isolat bakteri PK-IA171 yang akan digunakan untuk uji selanjutnya.

Identifikasi Bakteri

Isolat PK-IA171 yang memiliki aktivitas proteolitik selanjutnya dilakukan identifikasi. Hasil identifikasi isolat pada Laboratorium Uji Bakteriologi Balai Veteriner Lampung menunjukkan bahwa isolat bakteri merupakan *Klebsiella* sp. Identifikasi bakteri yang dilakukan, yaitu dengan pewarnaan gram dan uji biokimia. Isolat bakteri diidentifikasi secara morfologi yaitu dengan menumbuhkannya dalam media selektif yang bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri. Media yang digunakan adalah media BA, MC dan EMB kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada ketiga media tersebut, bakteri hanya tumbuh pada media EMB, menurut Kusnadi (2003) media EMB adalah media selektif untuk menumbuhkan bakteri gram negatif. Lalu selanjutnya dilakukan uji pewarnaan gram untuk menentukan secara pasti bahwa isolat bakteri termasuk ke dalam golongan bakteri gram positif atau gram negatif. Pewarnaan gram dilakukan dengan penambahan kristal violet, lugol, etanol dan sapronin.

Ketika olesan bakteri yang terfiksasi dikenai larutan ungu kristal, sel berwarna ungu. Melalui fiksasi warna dengan iodium sel tetap berwarna ungu. Lalu dilakukan penambahan alkohol sehingga melunturkan atau memucatkan zat warna ungu sehingga sel menjadi tak berwarna. Kemudian diberikan pewarna tandingan (safranin) sehingga menyebabkan sel menyerap zat pewarna ini dan menjadi merah. Warna merah menyatakan bahwa isolat bakteri merupakan bakteri gram negatif. Proses selanjutnya dilakukan uji biokimia. Uji tersebut diantaranya adalah uji TSIA, uji katalase, uji MR-VP, uji sitrat dan uji glukosa. Hasil uji reaksi biokimia isolat *Klebsiella* sp. dapat dilihat pada Tabel 1.

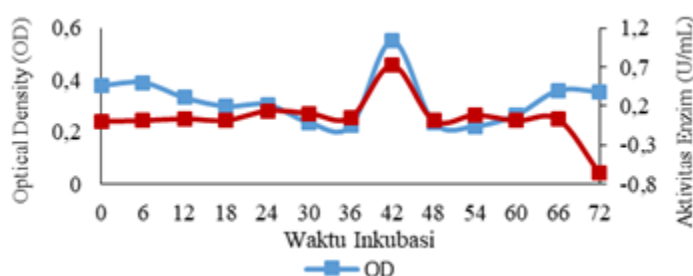
Tabel 1. Hasil uji biokimia *Klebsiella* sp.

Uji Biokimia	Hasil
Katalase	+
Sitrat	+
VP	+
Metil Merah	-
Uji TSIA	
- Gas	+
- H ₂ S	-

Glukosa (gas)	+
(Koneman <i>et al.</i> , (1983))	

Waktu Optimum Produksi Protease dan Kurva Pertumbuhan Bakteri

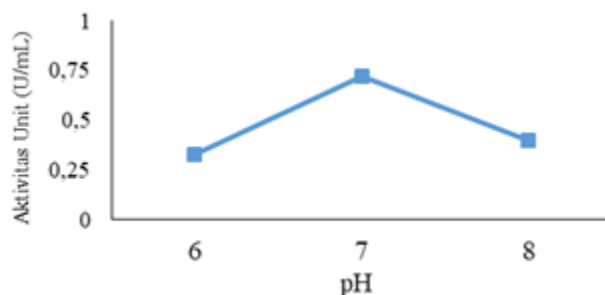
Kurva pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim mencapai fase stasioner dengan nilai aktivitas tertinggi pada jam ke-42 sebesar 0,7199 U/mL. Waktu inkubasi produksi protease optimum digunakan sebagai waktu panen yang dihasilkan pada saat produksi protease.



Gambar 2. Waktu optimum produksi protease dan kurva pertumbuhan isolat

Kondisi pH Optimum Pertumbuhan Bakteri untuk Produksi Protease

Nilai aktivitas enzim protease pada penentuan pH optimum pertumbuhan bakteri untuk produksi enzim protease tertinggi pada media susu skim, yaitu dengan pH 7 sebesar 0,7199 U/mL. Dari hasil yang didapat bahwa kondisi pH optimum yang digunakan untuk memproduksi enzim protease, yaitu media susu skim dengan pH 7. Konformasi fungsional protease *Klebsiella sp.* tercapai pada pH 7, pada pH kurang dari 7 dan di atas 7 aktivitas enzim rendah disebabkan adanya perubahan struktur tiga dimensi pada enzim, sehingga protein tidak dapat berikatan dengan sisi aktif protease.



Gambar 3. pH optimum pertumbuhan bakteri *Klebsiella sp.* untuk produksi enzim protease

Dari hasil yang didapat bahwa kondisi pH optimum yang digunakan untuk produksi enzim protease, yaitu media susu skim dengan pH 7, hal ini dapat dijelaskan bahwa bakteri *Klebsiella sp.* termasuk bakteri yang optimum tumbuh pada media pertumbuhan di rentang pH netral.

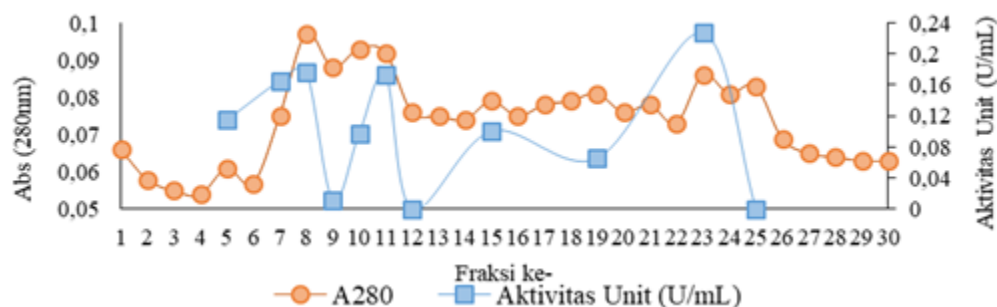
Produksi Enzim Protease

Bakteri *Klebsiella sp.* ditumbuhkan pada media produksi dengan 1% susu skim pada pH 7 selama 42 jam disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit untuk didapatkan ekstrak kasar. Ekstrak kasar enzim protease yang dihasilkan memiliki nilai aktivitas sebesar 0,2137 U/mL, kadar protein 7,731 mg/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,0276 U/mg.

Pemurnian Enzim Protease

Hasil uji aktivitas protease terhadap fraksi-fraksi hasil pemurnian amonium sulfat diketahui FE 60-80% memiliki aktivitas unit dan aktivitas spesifik tertinggi yaitu aktivitas unit sebesar 0,1710 U/mL, aktivitas spesifik sebesar 0,2355 U/mg. Namun, pada beberapa fraksi lainnya masih terdapat aktivitas unit enzim yang cukup tinggi, hal ini menunjukkan bahwa masih ada enzim yang belum terendapkan pada fraksi-fraksi tersebut. Untuk meminimalisir enzim yang belum terendapkan dilakukan pembagian pola fraksi dalam dua tingkat kejenuhan, yaitu 0-20 dan 20-90%. Hasil fraksi fraksi tertinggi ditunjukkan pada fraksi 20-90% dengan aktivitas unit sebesar 0,3894 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,1961 U/mg.

Enzim hasil pemurnian dengan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik tertinggi dilanjutkan pemurnian dengan dialisis, yang bertujuan untuk menghilangkan molekul garam dan ion-ion pengganggu lainnya. Enzim protease hasil dialisis memiliki aktivitas unit sebesar 0,3621 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 0,2038 U/mg. Terjadi tingkat kemurnian sebanyak 7,3 kali lebih murni dibandingkan ekstrak kasar enzim sebelum pemurnian. Enzim hasil dialisis dilanjutkan ke tahap pemurnian tahap akhir dengan kromatografi filtrasi gel. Metode pemurnian enzim yang digunakan pada penelitian dilakukan untuk pemisahan protein berdasarkan berat molekul. Fraksi-fraksi enzim pada kromatografi filtrasi gel yang didapat selanjutnya diuji kadar protein dan aktivitas enzimnya. Hasil pemurnian amilase dengan kromatografi filtrasi gel menggunakan Sephadex G-75 ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Profil hubungan A280 dengan nilai aktivitas enzim (U/mL) kromatografi filtrasi gel

Pada data Tabel 2. terjadi peningkatan aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian enzim protease dari ekstrak kasar hingga tingkat pemurnian tahap akhir. Sedangkan kadar protein dan perolehan hasil (%) enzim mengalami penurunan. Aktivitas spesifik enzim dipengaruhi oleh kadar protein, semakin tinggi aktivitas spesifik enzim maka semakin tinggi kemurnian enzim tersebut. Hal ini menunjukkan terjadinya pemisahan protein lain yang tidak dikehendaki. Peningkatan aktivitas spesifik enzim dan penurunan kadar protein pada tiap tahapan pemurnian menunjukkan bahwa kemurnian enzim yang diperoleh semakin meningkat.

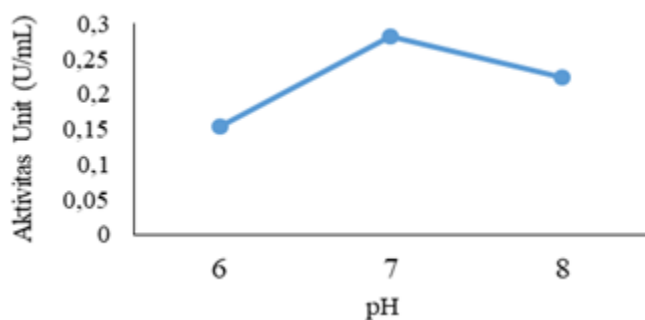
Tabel 2. Pemurnian enzim protease dari *Klebsiella sp*

Tahap kemurnian	Volume enzim Hasil (mL)	Aktivitas unit (U/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Aktivitas total (U)	Aktivitas (kali)
Ektrak Kasar 100	500	0,2137	7,731	0,0276	106,85	1
Fraksi Ammonium 145	400	0,3894	1,986	0,1961	155,79	7,0
Sulfat (20-90)%						
Dialisis 8	25	0,3621	1,776	0,2038	9,05	7,3
Filtrasi 1 gel	5	0,2259	0,839	0,2693	1,12	9,7

Karakterisasi Enzim Protease

a. pH optimum

Pada penelitian ini, untuk mengetahui pH optimum protease dalam menghidrolisis larutan kasein dalam buffer fosfat 0,05 M dengan pH divariasikan 6, 7 dan 8 kemudian ditambahkan 1 mL enzim selanjutnya, diinkubasi pada suhu 35 °C, selama 30 menit.

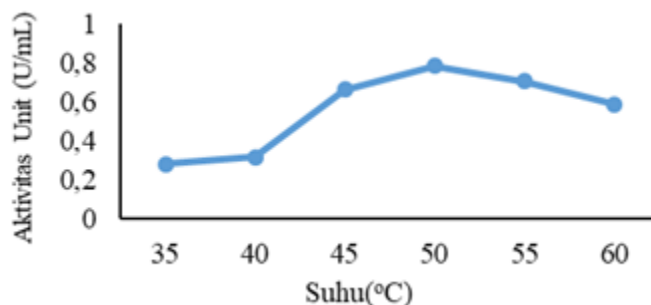


Gambar 5. Pengaruh pH pada aktivitas enzim protease dalam reaksi hidrolisis

Pada Gambar 5 menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian pada karakterisasi pH optimum memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi sebesar 0,282 U/mL pada pH 7. Penelitian Baehaki dkk., (2004) karakterisasi pH optimum enzim protease yang dihasilkan dari bakteri *Klebsiella sp.* pada pH 7. pH optimum akan tercapai bila terjadi kesesuaian konformasi antara sisi katalitik enzim dengan substrat yang menyebabkan terbentuknya kompleks enzim substrat yang maksimal, karena gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan sehingga menghasilkan produk yang maksimal.

b. Suhu Optimum

Suhu optimum enzim protease ditentukan dengan memvariasikan suhu inkubasi pada pH optimumnya. Inkubasi dilakukan selama 30 menit pada masing-masing variasi suhu, yaitu 35, 40, 45, 50, 55, 60.

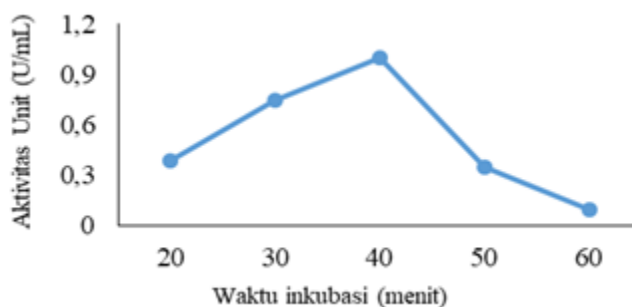


Gambar 6. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim protease dalam reaksi hidrolisis

Dari Gambar 6 didapatkan temperatur optimum dari *Klebsiella sp.* adalah 50°C. Pada temperatur kurang dari 50 °C, terjadi peningkatan aktivitas yang tidak terlalu besar dari ezim protease sehingga kestabilan enzim meningkat. Dengan meningkatnya temperatur, energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi bertambah sehingga molekul yang bereaksi semakin banyak dan produk yang dihasilkan makin banyak. Suhu optimum protease ini sama dengan penelitian Baehaki dkk., (2004) pada karakterisasi suhu optimum enzim protease yang dihasilkan dari bakteri *Klebsiella sp.*, yaitu 50 °C.

c. Waktu Inkubasi

Waktu inkubasi optimum protease dari isolat bakteri *Klebsiella sp.* dalam menghidrolisis larutan kasein dalam buffer fosfat 0,05 M pH 7 ditentukan dengan cara menginkubasi pada suhu 50 °C, waktu inkubasi divariasikan, yaitu 20, 30, 40, 50, dan 60 menit.

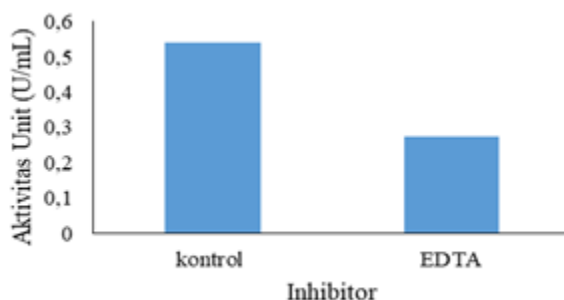


Gambar 7. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim protease dalam reaksi hidrolisis

Berdasarkan Gambar 7 menyatakan bahwa waktu inkubasi optimum enzim protease ialah pada 40 menit, aktivitas enzim sebesar 0,9957 U/mL. Pada grafik diatas aktivitas enzim semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi sampai pada waktu optimum. Setelah mencapai aktivitas maksimum pada waktu optimum, aktivitas enzim akan menurun seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi yang dapat disebabkan karena adanya perbedaan waktu yang dibutuhkan oleh setiap enzim untuk bereaksi dengan substrat. Pada penelitian Maziah (2009) melaporkan bahwa waktu inkubasi optimum aktivitas enzim protease termofilik adalah 40 menit.

Pengaruh senyawa EDTA

Pada penelitian ini dilakukan penambahan senyawa EDTA pada uji aktivitas protease pada kondisi optimum yang bertujuan untuk mengidentifikasi golongan enzim protease dari bakteri *Klebsiella sp.* yang ditandai dengan menurunnya aktivitas enzim protease. Pada penelitian ini digunakan senyawa EDTA dalam bentuk garam, yaitu Na_2EDTA .

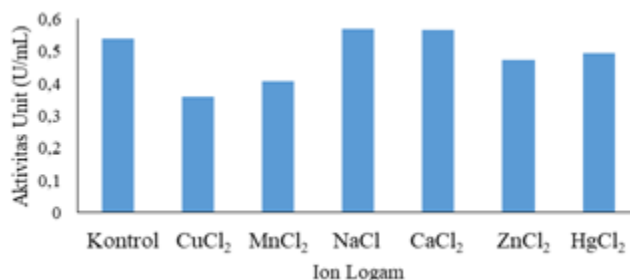


Gambar 8. Pengaruh EDTA pada aktivitas enzim protease

Berdasarkan hasil penelitian pada Gambar 8 penambahan senyawa EDTA pada enzim protease lebih mampu menurunkan aktivitas enzim secara drastis dibandingkan dengan logam HgCl_2 yang hanya menurunkan sedikit aktivitas enzim protease. EDTA berperan sebagai asam Lewis atau ligan dan logam berperan sebagai basa Lewis atau ion pusat. Pada logam HgCl_2 ditemukan dapat berperan sebagai inhibitor protease jenis sulfhidril. Dari hasil menunjukkan senyawa EDTA dapat menghambat enzim protease dari *Klebsiella sp.* Hal ini dimungkinkan karena EDTA mengkhelat logam – logam yang berperan penting menjaga stabilitas dan sebagai kofaktor enzim. Maka enzim protease ini termasuk kedalam golongan enzim metaloprotease. Hal ini dapat dikatakan karena pada aktivitas protease dari penelitian ini stabil dalam kondisi pH yang netral bahwa metaloprotease membutuhkan ion logam untuk aktivitas optimalnya, dan aktivitasnya akan diinhibisi dengan adanya agen pengkelat logam, yaitu EDTA (Yang *et al.*, 2000).

Pengaruh Ion Logam

Pada penelitian ini digunakan beberapa ion logam untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas protease dalam kondisi suhu dan pH optimum yang telah diperoleh. Ion logam tersebut adalah Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ dan Ca^{2+} .



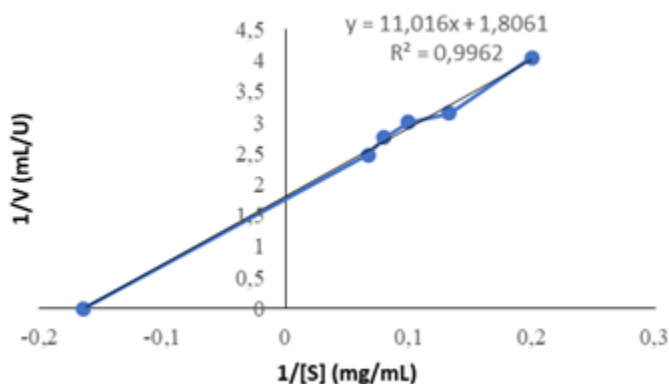
Gambar 9. Pengaruh ion logam pada aktivitas enzim protease dalam reaksi hidrolisis

Pada Gambar 9 menunjukkan aktivitas protease dengan penambahan ion logam terlihat bahwa hampir semua ion logam yang diuji menurunkan aktivitas protease, kecuali ion logam NaCl dan CaCl₂. Ion logam Na⁺ dan Ca²⁺ meningkatkan aktivitas enzim sehingga ion logam tersebut merupakan aktivator enzim protease, dan ion logam Cu²⁺, Mn²⁺, dan Zn²⁺ menurunkan aktivitas protease, sehingga logam tersebut merupakan inhibitor. Pada penambahan ion logam Ca²⁺ memberikan peningkatan aktivitas enzim, hal ini dapat terjadi karena ikatan yang terbentuk antara enzim dan ion logam atau antara substrat dan ion logam tidak terlalu kuat sehingga tidak menyebabkan perubahan konformasi enzim. Pada ion Na⁺ aktivitas enzim meningkat, hal ini dapat terjadi sesuai dengan habitat bakteri sebagai sumber protease yang berasal dari tanah sisa olahan pangan sehingga stabilitas pada larutan garam diduga sesuai dengan sifat protease *Klebsiella sp.*

Pada penambahan ion logam transisi, yaitu ion logam Cu²⁺, Mn²⁺ dan Zn²⁺ mengalami penurunan aktivitas protease. Penurunan pada aktivitas enzim ini dimungkinkan karena adanya interaksi antara ion logam transisi dengan molekul protein enzim yang menyebabkan terjadinya pemutusan ikatan dalam struktur protein enzim. Pada penelitian Soeka dan Sulistiani (2017) Penambahan ion logam Ca²⁺ dapat meningkatkan aktivitas enzim, dan penambahan ion – ion logam Mn²⁺ dan Cu²⁺ menurunkan aktivitas enzim protease yang berperan sebagai inhibitor. Pada penelitian Xiuqin *et al.*, (2013) penambahan ion logam Cu²⁺ dan Ca²⁺ dapat meningkatkan aktivitas enzim protease dari *S. Maltophilia*. Perbedaan nilai aktivitas enzim protease pada masing – masing ion logam diduga disebabkan karena beberapa faktor diantaranya kondisi suhu, pH dan perbedaan konsentrasi ion – ion logam itu sendiri.

Penentuan Kinetika (Nilai K_M dan V_{maks})

Penentuan nilai K_M dan V_{maks} enzim protease dihitung berdasarkan aktivitas enzim tersebut pada variasi konsentrasi substrat yaitu 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 dan 1,25% dengan pH optimum dan suhu optimum. Berdasarkan hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diperoleh grafik transformasi Lineweaver-Burk (Gambar 10).

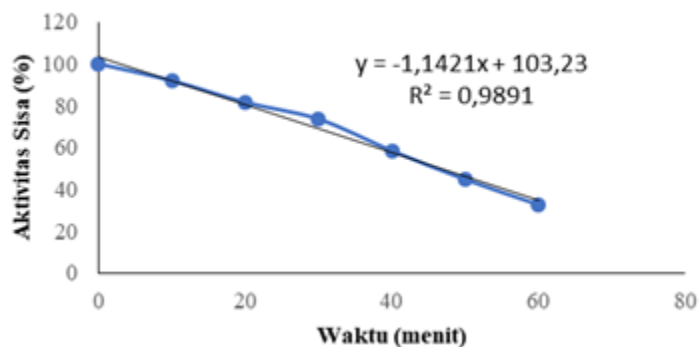


Gambar 10. Grafik Lineweaver-Burk enzim hasil pemurnian

Gambar 10 menunjukkan grafik transformasi Lineweaver-Burk. Nilai K_M dan V_{maks} ditentukan dengan persamaan $y = ax + b$, dari hasil perhitungan diperoleh $b = 1/V_{maks}$ dan $a = K_M/V_{maks}$ sehingga nilai V_{maks} adalah $0,6 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{menit}^{-1}$ dan nilai K_M adalah $6,1 \text{ mg/mL}$ substrat. Konstanta Michaelis-Menten (K_M) menunjukkan konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai kecepatan maksimum. Harga K_M lebih besar jika dibandingkan dengan isolat *Bacillus* sp. UJ132 yang mempunyai nilai K_M sebesar $4,59 \text{ mg/mL}$ substrat (Sumardi dkk., 2019). Harga K_M yang makin rendah menunjukkan bahwa enzim tersebut semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimum (V_{maks}).

Termodinamika Stabilitas Enzim

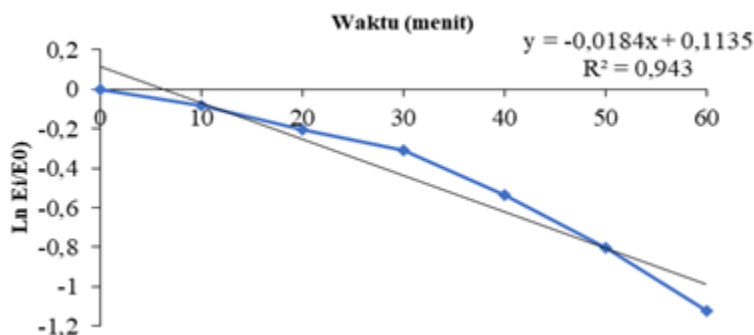
Stabilitas termal enzim protease ditentukan dengan menginkubasi enzim pada suhu optimumnya selama 60 menit, tiap interval 10 menit masing-masing enzim ditentukan aktivitasnya.



Gambar 11. Hubungan antara stabilitas termal terhadap aktivitas sisa (%) enzim hasil pemurnian

Pada Gambar 11 aktivitas sisa (%) enzim protease hasil pemurnian pada menit ke-60 memiliki aktivitas sebesar 32,6067%. Kemudian, data aktivitas sisa enzim t_0 ($[E]_0$) dan aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi pada t_i ($[E]_i$) dibuat grafik linier. Data ini digunakan untuk menentukan nilai k_i .

Perubahan Laju Inaktivasi Termal (k_i), Waktu Paruh ($t_{1/2}$), dan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)



Gambar 12. Hubungan $\ln(E_i/E_0)$ enzim protease hasil pemurnian

a. Konstanta Laju Inaktivasi Termal (k_i)

Nilai konstanta laju inaktivasi (k_i) didapat dari nilai kemiringan (slop) grafik linier antara data $\ln(E_i/E_0)$ terhadap waktu (t). Pada penelitian ini didapatkan nilai k_i sebesar 0,0184 menit^{-1} . Menurut Nanik dkk., (2016) menunjukkan bahwa nilai k_i hasil pemurnian sebesar 0,085 menit^{-1} . Nilai k_i yang semakin rendah menunjukkan bahwa enzim semakin kurang fleksibel dalam air. Hal ini akan mengurangi ketidakterlipatan (*unfolding*) protein

sehingga struktur enzim menjadi lebih kaku dan enzim menjadi lebih stabil (Yang *et al.*, 1996).

b. Waktu Paruh ($t_{1/2}$)

Waktu paruh ($t_{1/2}$) adalah waktu dimana enzim kehilangan setengah aktivitasnya setelah meluruhkan substrat hingga konsentrasinya menjadi setengah konsentrasi awal (Baysal *et al.*, 2014). Pada penelitian ini didapatkan nilai $t_{1/2}$ sebesar 37,7 menit. Menurut Nanik dkk., (2016) menunjukkan bahwa nilai $t_{1/2}$ hasil pemurnian sebesar 8,153 menit. Semakin lama waktu paruh enzim maka inaktivasi enzim menjadi lebih lama yang menjadikan stabilitas enzim lebih baik (Selvarajan *et al.*, 2015).

c. Perubahan Energi Akibat Denaturasi (ΔG_i)

Energi bebas akibat denaturasi (G_i) adalah energi bebas yang dibutuhkan untuk mendenaturasi enzim dari keadaan awal. Pada penelitian ini didapatkan nilai ΔG_i sebesar 101,0565 kJ mol⁻¹. Menurut Nanik dkk., (2016) menunjukkan bahwa nilai ΔG_i hasil pemurnian sebesar 96,944 kJ mol⁻¹. Semakin besar nilai ΔG_i suatu enzim, maka enzim tersebut akan semakin sulit terdenaturasi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa biakan bakteri yang ditumbuhkan pada kondisi optimum (media pertumbuhan mengandung skim milk 1%, pH 7 pada temperatur kamar) menunjukkan fase stasioner pertumbuhan tercapai pada waktu inkubasi 42 jam dengan aktivitas enzim sebesar 0,719 U/mL. Tahapan pemurnian enzim dari Ekstrak kasar, fraksinasi dengan Ammonium sulfat, dialisis dan kromatografi dengan *Sephadex* G-75 menghasilkan enzim dengan aktivitas berturut-turut sebesar 0,3894; 0,3621; dan 0,2259 U/mL. Karakterisasi aktivitas enzim protease, yaitu optimum pada pH 7, suhu 50 °C, dan waktu inkubasi 40 menit. Pengaruh penambahan senyawa EDTA dapat menurunkan aktivitas enzim secara drastis dan penambahan ion-ion logam konsentrasi 5 mM menunjukkan kecenderungan ion logam Na⁺ dan Ca⁺ bersifat sebagai aktivator dan ion logam Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ bersifat inhibitor terhadap emzim. Enzim protease memiliki nilai K_M 6,1 mg mL⁻¹ substrat dan V_{maks} 0,6 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Nilai k_i , $t_{1/2}$ dan ΔG_i berturut-turut adalah 0,0184 menit⁻¹, 37,7 menit dan 101,0565 kJ mol⁻¹.

DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki, A., Suhartono, M.T., Palupi, N.S., dan Nuhayati, T. (2004). Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella sp.* Prosiding Seminar Nasional dan Kongres PATPI. 281-287.
- Baysal, Z., Bukut, Y., Yavuz, M., and Aytekin, C. (2014). Immobilization of α -Amylase Via Adsorption Onto Bentonite/Chitosan Composite: Determination of Equilibrium, Kinetics and Thermodynamic Parameters. *Starch*. 66: 484-490.
- Kamelia, R., Sindumarta, M., dan Natalia, D. (2005). Isolasi dan Karakterisasi Protease Intraselular Termotabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. Prosiding Seminar Nasional MIPA. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kazan, D., Ertan, H. and Erarslan, A. (1997). Stabilization of Escherichia Coli Penicillin G Acylase Against Thermal Inactivation By Cross-Linking with Dextran Dialdehyde Polymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48 (2):191–197.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., and Sommers, H.M. (1983). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 2nd*. J. B. Lippincott Company. Philadelphia.
- Kosim, M., dan Putra, S.Y. (2009). Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis*. Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010.
- Kusnadi. (2003). *Mikrobiologi (Common Teksbook)*. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Maziah, Z. (2009). Produksi dan Karakterisasi Protease Isolat Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Plantungan – Kendal. *Tugas Akhir*. Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Nanik, S., A.S. Yandri, dan Hadi, S. (2016). Peningkatan Kestabilan Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia. *Jurnal Analis Kesehatan*. 5 (1): 475-482.
- Selvarajan, E., Mohanasrinivasan, V., Subathra, D.C., and George, P.D.C. (2015). Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* 38 (9):16551669.
- Soeka, Y. S., dan Sulistiani. (2014). Karakterisasi Protease *Bacillus subtilis* A1 InaCC B398 Yang Diisolasi Dari Terasi Samarinda. *Berit Biologi*. 13 (2): 206-207.
- Soeka, Y. S., dan Sulistiani. (2017). Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri *Stenotrophomonas sp.* Asal Gunung Bromo, Jawa Timur. *Berita Biologi*. 16 (2): 205-209.
- Sumardi, Farisi, S., Ekowati, C.N., dan Diana, S.M. (2019). Aktivitas dan Karakterisasi Protease Isolat *Bacillus sp.* (UJ132) Secara Kualitatif dan Kuantitatif. *Jurnal Riset Akuakultur*, 14 (3): 193-199.
- Toccalino, P.L., Johnson, R.L., and Boone, D.R. (1993). Nitrogen Limitation and Nitrogen Fixation During Alkane Biodegradation in a Sandy Soil. *Appl. Environ. Microbio*, 59: 2977-2983.

- Wahyuntari, B., and Hendrawati, H. (2012). Properties of an Extracellular Protease of *Bacillus Megaterium* DSM 319 as Depilating Aid of Hides. *Microbiology Indonesia*, 6 (2).
- Xiuqin, C., Chunxia, B., Weiqi, S., Wei, Z., Jie, S., Yumei, D., Bin, W., Meiyong, Y., and Zhiyong, Y. (2013). Purification and Stability Characteristics of an Extracellular Alkaline Serine Protease From a Newly Isolated *Stenotrophomonas maltophilia* Strain D2. *African Journal of Microbiology Research*, 7(33): 4244-4250.
- Yang, Z., Michael, D., Robert, A., Fang, X.Y., and Alan, J.R. (1996). Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzyme Microb. Technol.*, 18: 82-89.
- Yang, J. -K., Shih, I.-L., Tzeng, Y.-M., Wang, S.- L. (2000). Production and Purification of Protease from *Bacillus subtilis* That Can Deproteinize Crustacean Wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 406-413.