

ISOLASI BAKTERI DAN KARAKTERISASI PROTEASE DARI SALURAN PENCERNAAN IKAN RAWA INDRALAYA, SUMATERA SELATAN

Ace Baehaki¹, Rinto² dan Eka Relis¹

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri penghasil protease dan karakterisasi protease dari saluran pencernaan ikan rawa. Dari 34 koloni bakteri yang didapatkan, tiga isolat memiliki indeks proteolitik lebih dari 1 (G1, G3 dan N3). Waktu produksi optimum dari tiga isolat tersebut adalah 48 jam dengan pH optimum protease G1, G3 dan N3 adalah 8 dan suhu optimum protease 40 °C. Pengaruh ion logam (Fe, K, Mn dan Zn) menunjukkan semua ion logam menghambat aktivitas protease semua isolat bakteri kecuali Zn²⁺ (5 mM) untuk protease G1, Fe²⁺ (1 dan 5 mM) dan Zn²⁺ (5 mM untuk protease G3 dan Fe²⁺ (5 mM) untuk protease N3. Penambahan inhibitor spesifik (EDTA) menunjukkan EDTA menghambat semua protease isolat bakteri dari saluran pencernaan ikan. Hasil analisis ini menunjukkan semua protease termasuk metaloprotease berat molekul protease menggunakan SDS-PAGE dan zimogram menunjukkan protease G1 memiliki berat molekul sekitar 133 kD, protease G3 memiliki berat molekul sekitar 127 kD dan protease N3 memiliki berat molekul sekitar 116 kD.

Kata kunci : Protease, Isolasi, bakteri, rawa.

PENDAHULUAN

Enzim merupakan molekul polimer yang beragam yang dihasilkan oleh sel hidup. Keragaman ini bukan hanya di dalam bentuk dan ukurannya, tetapi juga dalam peranannya. Di dalam sel sumber, enzim terlibat dalam setiap reaksi biokimia, mulai dari konveksi energi, metabolisme makanan, mekanisme pertahanan sel, komunikasi antar sel, sampai ke konversi sifat keturunan (Suhartono, 1989).

Protease atau enzim katalitik adalah enzim yang memiliki daya katalitik terhadap ikatan peptida dari suatu molekul polipeptida atau protein. Enzim ini dihasilkan oleh semua makhluk hidup termasuk mikroba. Enzim hidrolitik ini digunakan oleh bakteri untuk memperoleh sumber karbon dan energi dengan menghancurkan polimer inang menjadi gula sederhana dan asam amino (Salyers & Whitt, 1994).

Salah satu sumber enzim protease adalah dari mikroba. Penelitian mikroba sebagai sumber alami penghasil enzim ini sudah banyak dilakukan akan tetapi penelitian mikroba dengan habitat tertentu seperti dari rawa masih sedikit. Sehingga penelitian enzim protease dari mikroba rawa penting untuk dilakukan sebagai alternatif baru sebagai sumber penghasil enzim mengingat daerah Sumatera Selatan termasuk daerah Indralaya memiliki daerah rawa yang sangat luas yang tentunya terdapat mikroba yang memiliki keanekaragaman yang tinggi sebagai penghasil protease.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama adalah tiga isolat bakteri yang memiliki indeks proteolitik yang tinggi berdasarkan hasil pemilihan dari saluran pencernaan ikan rawa. Bahan kimia penting yang digunakan adalah casein hammerstein (Merck), standar L-tirosin (Merck), pereaksi elektroforesis SDS-PAGE dan zimogram.

Metode

Isolasi mikroba rawa

Isolasi mikroba dilakukan dengan mengambil sampel pencernaan ikan rawa secara aseptik. Sampel sebanyak 0,1 mL ditumbuhkan dalam cawan petri dengan media *Luria broth agar* (LBA) yang sebelumnya dilakukan pengenceran dari 10¹ sampai 10⁻⁵ untuk mendapatkan biakan bakteri murni, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C.

¹) Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya

Uji proteolitik

Uji proteolitik dilakukan dengan menggunakan media skim milk agar (SMA) yaitu media LBA yang ditambah dengan susu skim 2%. Isolat ditusukkan dalam media SMA, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas proteolitik dari bakteri rawa yang ditumbuhkan pada media SMA ditunjukkan dengan terlihatnya areal bening yang muncul di sekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur diameter areal bening dan diameter koloni bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan diameter areal bening dengan diameter koloni bakteri.

Penentuan waktu optimum produksi protease

Bakteri diinokulasi sebanyak 1-2 ose pada media *Juria broth* (LB) dengan komposisi tripton 1%, NaCl 1% dan yeast extract 0,5%. Proses diawali dengan penentuan umur prekultur produksi protease (dalam media LB). Produksi protease dilakukan pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan mengukur optical density (OD) sampai nilai OD = 0,8 pada $\lambda = 620$ nm. Media LB yang sudah mempunyai OD = 0,8 diambil 10% dari jumlah media kemudian ditambahkan pada media LB yang baru sebagai media untuk memproduksi protease. Pengambilan sampel dilakukan setiap 8 jam selama 56 jam dan diukur nilai OD, aktivitas protease dan kadar protein. Ekstraksi enzim protease dilakukan dengan cara sentrifugasi media pertumbuhan bakteri dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Dengan teknik ini, sel akan mengendap oleh adanya gaya gravitasi sedangkan enzim tetap terdapat pada supernatan. Supernatan sebagai sampel diuji aktivitas protease dan kadar proteinnya.

Pengukuran aktivitas protease

Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer *et al.* (1983) dengan menggunakan substrat kasein Hammerstein 2% (b/v). Prosedur pengujian aktivitas protease adalah: mereaksikan 0,2 mL enzim dengan 1 mL substrat kasein Hammerstein dan 1 mL bufer. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,2 M TCA. Selanjutnya larutan diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Dari campuran hasil sentrifugasi diambil supernatan dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Na_2CO_3 , 0,4 M kemudian ditambahkan pereaksi folin Ciocalteau (1:2) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Hasil inkubasi diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 578$ nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu imol produk tirosin per menit pada kondisi optimum pengukuran.

Pengukuran kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) Fraction V sebagai standar protein. Sebanyak 100 mg BSA ditimbang dan ditambahkan 25 mL aquades. Larutan kemudian dikocok pelan-pelan, setelah larut, diencerkan sampai 50 mL. Konsentrasi akhir larutan stok untuk standar ini adalah 2 mg/mL. Kemudian sederetan larutan standar dibuat dengan menggunakan larutan stok di atas. Langkah selanjutnya adalah memipet masing-masing larutan sampel dalam tiap tabung sebanyak 0,1 mL dan sebanyak 5 mL pereaksi Bradford ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Blanks dibuat dengan cara mencampurkan 0,1 mL dan direaksikan dengan 5 mL pereaksi Bradford. Setelah sekitar 5 menit, masing-masing campuran reaksi diukur absorbansinya pada $\lambda = 595$ nm.

Karakterisasi protease

Uji karakterisasi protease yang meliputi pengaruh pH (6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9) dilakukan menggunakan bufer Tris-HCl, pengaruh suhu (30; 40; 50; 60; 70 °C), ion logam (NaCl ; KCl ; MnCl_2 ; ZnCl_2 dan FeCl_3) dan inhibitor spesifik (EDTA). Konsentrasi ion logam dan inhibitor spesifik yang digunakan masing-masing adalah 1 dan 5 mM.

Penentuan berat molekul

Penentuan berat molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (Laemmli, 1970) dan zimogram (Choi *et al.*, 2001). Pada metode SDS PAGE, pewarnaan dilakukan dengan silver staining yaitu : gel direndam dalam larutan fikasasi (25% metanol dan 12% asam asetat) selama 1 jam kemudian direndam dalam 50% etanol

selama 20 menit, kemudian diganti dengan 30% etanol selama 2 x 20 menit, larutannya diganti dengan enhancer kemudian dicuci dengan akuadestilata, setelah dicuci ditambahkan larutan silver nitrat selama 30 menit, kemudian dicuci lagi dengan akuadestilata 2 x 20 detik dan ditambahkan larutan campuran Na_2CO_3 dan formaldehida dan terakhir dengan larutan fiksasi. Prosedur zimogram adalah: gel akrilamid 8% dikopolimerisasi dengan substrat kasein 2%, selanjutnya gel dilakukan elektroforesis, gel direndam dengan Triton X-100 2,5% selama 1 jam dan dilakukan inkubasi dalam buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8 selama 24 jam. Setelah diinkubasi gel diwarnai dengan pewarna comassie brilliant blue R-250.

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi dan Uji Proteolitik Bakteri Penghasil Protease

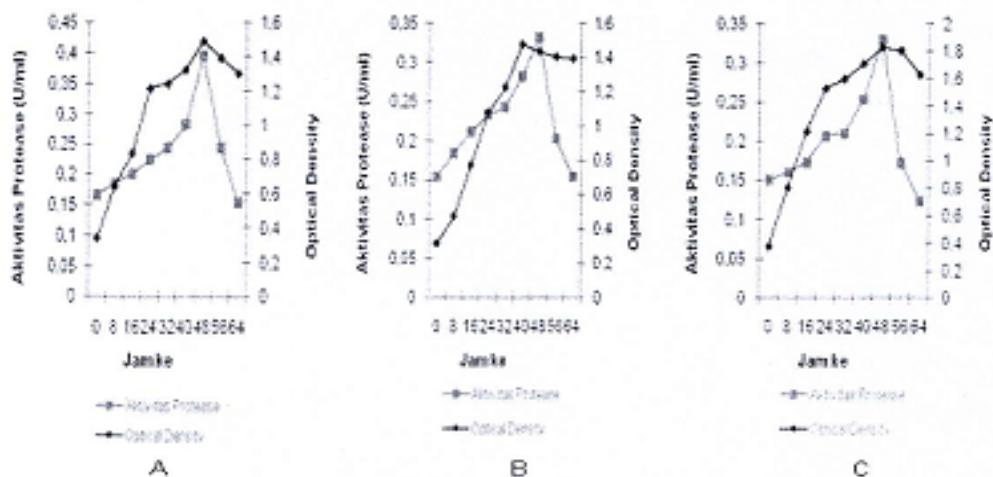
Pada proses isolasi diperoleh 34 isolat, yang kemudian diuji indeks proteolitiknya. Aktivitas proteolitik dari isolat bakteri pencernaan ikan rawa yang ditumbuhkan pada media SMA terlihat dari adanya area bening di sekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik bakteri dari saluran pencernaan ikan rawa yang mempunyai nilai > 1 dipilih untuk dianalisis aktivitas proteasennya (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji proteolitik isolat bakteri dari pencernaan ikan rawa.

Isolat	Indeks proteolitik
G1	1,4
G3	1,3
N3	1,5

Penentuan Waktu Optimum Produksi Protease

Hasil waktu optimum produksi protease dari isolat bakteri pencernaan ikan rawa ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Waktu produksi optimum protease dari isolat bakteri pencernaan ikan rawa.
(A= isolat G1, B=G3 dan C=N3)

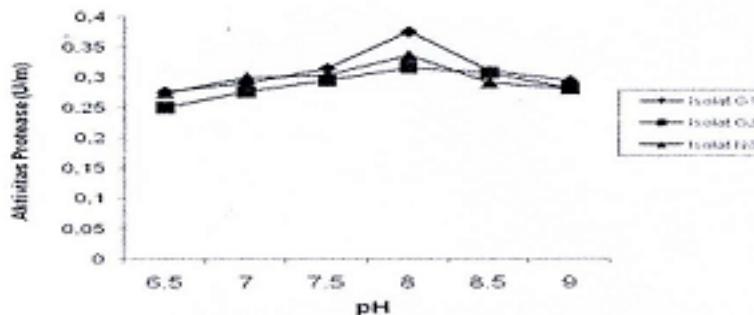
Protease isolat G1 (Gambar 1A) memiliki aktivitas tertinggi (0.395 IU/mL) setelah diinkubasi selama 48 jam dalam media LB. Protease diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi pada fase menjelang penurunan. Protease isolat G3 memiliki aktivitas tertinggi (0.331 IU/mL) setelah diinkubasi selama 48 jam, protease diproduksi pada fase penurunan (Gambar 1B). Untuk protease isolat N3

(Gambar 1C) memiliki waktu produksi optimum selama 48 jam (0.329 IU/mL). Penelitian lain pada produksi protease bakteri didapatkan bakteri dengan waktu produksi protease optimum yang sama dengan protease semua isolat dari pencernaan ikan rawa adalah *Bacillus subtilis* PE-11 (Adinarayana, et al., 2003) dan *Bacillus licheniformis* LbbI-11 (Olajuyigbe & Ajele, 2008).

Karakterisasi Ekstrak Kasar Protease

Pengaruh pH

Profil aktivitas pH dari suatu enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Gambar 2 memperlihatkan pH optimum aktivitas protease isolat bakteri tanah rawa.

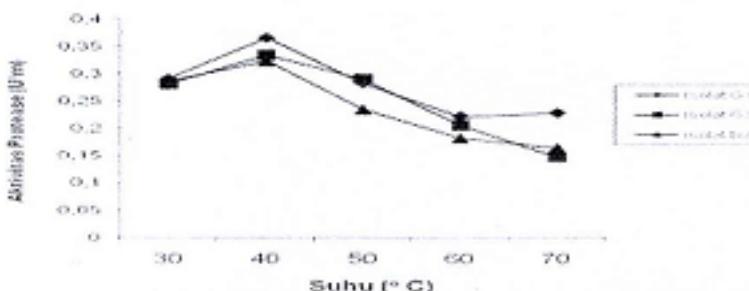


Gambar 2. Pengaruh pH pada aktivitas protease dari isolat saluran pencernaan ikan rawa.

Protease dari isolat G1, G3 dan N3 memiliki pH optimum 8. Protease bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki pH yang sama dengan isolat semua isolat dari pencernaan ikan rawa yaitu 8 (Baehaki et al., 2008). Diperkirakan perubahan keaktifan enzim diakibatkan oleh ionisasi pada gugus ionik enzim, pada sisi aktifnya atau sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan dalam mengubah substrat menjadi produk. Ionisasi juga dapat dialami oleh substrat atau kompleks enzim-substrat, yang juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Muchtadi et al., 1996).

Pengaruh Suhu

Pada umumnya setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu sampai suhu optimum tercapai. Setelah itu kenaikan lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dari isolat bakteri tanah rawa dapat dilihat pada Gambar 3.

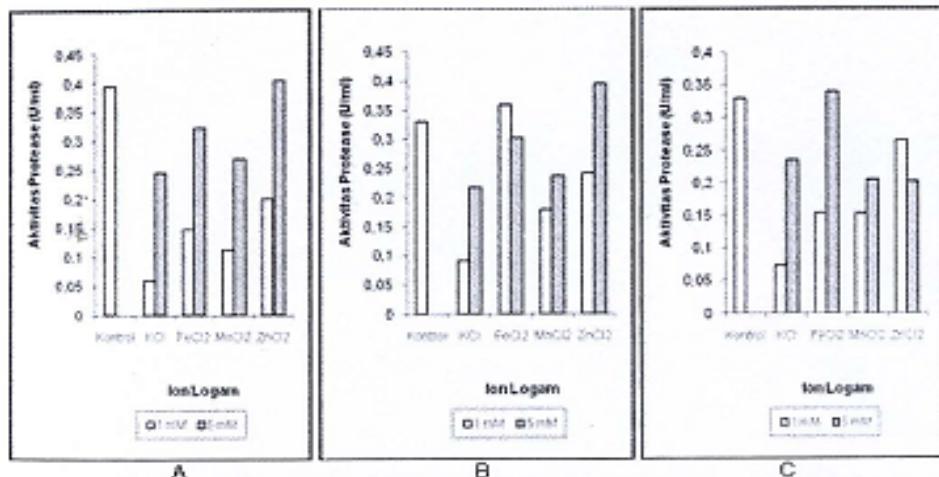


Gambar 3. Pengaruh suhu pada aktivitas protease dari isolat saluran pencernaan ikan rawa.

Hasil pengukuran aktivitas enzim pada berbagai suhu, menunjukkan suhu optimum protease isolat G1, G3 dan N3 adalah 40 °C. Suhu mempengaruhi laju reaksi katalisis enzim dengan dua cara. Pertama, kenaikan suhu akan meningkatkan energi molekul substrat dan pada akhirnya meningkatkan laju reaksi enzim. Peningkatan suhu juga berpengaruh terhadap perubahan konformasi substrat sehingga sisi aktif substrat mengalami hambatan untuk memasuki sisi aktif enzim dan menyebabkan turunnya aktivitas enzim. Kedua, peningkatan energi termal molekul yang membentuk struktur protein enzim itu sendiri akan menyebabkan rusaknya interaksi-interaksi non kovalen (ikatan hidrogen, ikatan van der walls, ikatan hidrofobik dan interaksi elektrostatik) yang menjaga struktur 3D enzim secara bersama-sama sehingga enzim mengalami denaturasi. Denaturasi menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaannya sehingga sisi aktif enzim berubah dan mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas enzim (Hames & Hooper, 2000).

Pengaruh ion logam dan inhibitor spesifik

Beberapa enzim membutuhkan ion logam sebagai kofaktor untuk mendukung efisiensi katalitik enzim. Logam tersebut membantu reaksi katalitik dengan cara mengikat substrat pada sisi pemotongan. Selain berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat, beberapa logam juga dapat mengikat enzim secara langsung untuk menstabilkan konformasi aktifnya atau menginduksi formasi situs pengikatan atau situs aktif suatu enzim. Gambar 4 memperlihatkan pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease isolat bakteri pencernaan rawa.



Gambar 4. Pengaruh ion logam pada protease dari isolat pencernaan ikan rawa.
(A= isolat G1, B=G3 dan C=N3)

Pada protease isolat G1 semua ion logam berfungsi sebagai inhibitor kecuali ion logam Zn (5 mM). Protease isolat G3, semua ion logam lainnya sebagai inhibitor kecuali Fe (1 dan 5 m) dan Zn (5 mM). Untuk protease isolat N3 hanya ion logam Fe (5 mM) yang bukan inhibitor sedangkan ion logam lainnya sebagai inhibitor. Karena dipengaruhi ion logam maka protease digolongkan metaloprotease. Adanya penghambatan ion logam terhadap aktivitas protease pada konsentrasi tertentu berkaitan dengan kekuatan ion, dimana kekuatan ion itu sendiri mempengaruhi konformasi atau struktur tiga dimensi dari protein enzim atau protein substrat (Suhartono, 1989).

Berdasarkan mekanisme reaksi yang dikatalisis, endopeptidase dapat dikelompokkan menjadi empat yaitu: protease serin, protease aspartat, protease sistein dan protease logam. Dalam penelitian ini penggolongan protease hasil produksi dilakukan dengan cara mereaksikan dengan senyawa-senyawa inhibitor spesifik. Adapun pengaruh inhibitor spesifik EDTA pada protease isolat bakteri pencernaan rawa terdapat pada Tabel 2.

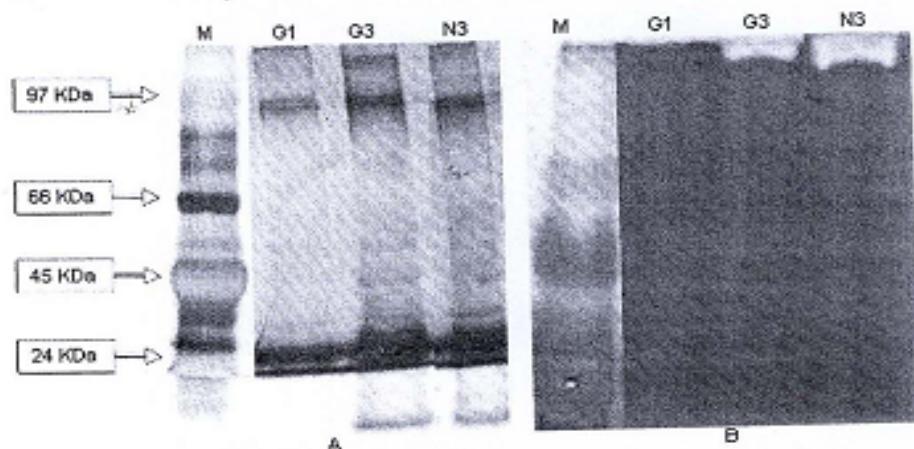
Tabel 2. Pengaruh inhibitor spesifik pada protease isolat bakteri pencernaan ikan rawa.

Jenis bakteri	Aktivitas residu (%)	
	EDTA 1 mM	EDTA 5 mM
Kontrol	100	100
Isolat G1	30,4	0
Isolat G3	71,8	0
Isolat N3	73,4	0

Tabel 2 menunjukkan EDTA (1 dan 5 mM) dapat menghambat protease dari isolat bakteri pencernaan ikan rawa. Hal ini dimungkinkan karena EDTA mengikat logam-logam yang berperan penting menjaga stabilitas serta logam yang berperan sebagai kofaktor enzim protease. Hal ini juga diperkuat dengan pemberian ion logam yang menunjukkan pemberian ion logam dapat mempengaruhi aktivitas protease. Karena protease dari bakteri pencernaan ikan rawa ini dipengaruhi oleh ion logam dan dihambat oleh EDTA, protease ini digolongkan sebagai metaloprotease. Protease bakteri lain dari perairan yang termasuk metaloprotease adalah *Aeromonas hydrophila* (Baehaki et al., 2004) dan *Alteromonas* sp. O-7 (Miyamoto et al., 2002).

Penentuan berat molekul dengan SDS PAGE dan Zimogram

Penentuan berat molekul dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (Sodium dodesil sulfat-Pollektilamide gel elektroforesis) dan Zimogram merupakan metode yang sudah digunakan secara luas. Hasil SDS-PAGE dan Zimogram protease isolat bakteri pencernaan ikan rawa dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil SDS PAGE dan Zimogram protease isolat bakteri pencernaan ikan rawa.
(M=marker, A=SDS-PAGE dan B=Zimogram)

Analisis SDS-PAGE pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat G1 memiliki 3 pita dengan berat molekul 31, 37 dan 133 kD, isolat G3 memiliki 7 pita dengan BM 19-133 kD dan isolat N3 memiliki 6 pita dengan BM sekitar 19-127 kD. Analisis Zimogram pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat G1 memiliki 1 pita dengan berat molekul 133 kD, isolat G3 memiliki 1 pita dengan BM 127 kD dan isolat N3 memiliki 1 pita dengan BM sekitar 116 kD. Sebagai perbandingan, bakteri TPS-2 yang dilisolasi dari kawah Tangkupan Perahu memiliki 2 pita dengan berat molekul 80 kD dan 45 kD (Wahyuntari et al., 2000).

KESIMPULAN

Protease isolat G1, G3 dan N3 memiliki waktu produksi optimum protease yang sama yaitu pada inkubasi selama 48 jam dengan pH dan suhu optimum yang sama yaitu pH 8 dan suhu 40 °C. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protase menunjukkan pada protease isolat G1 semua ion logam berfungsi sebagai inhibitor

kecuali ion logam Zn (5 mM); protease isolat G3, semua ion logam lainnya sebagai inhibitor kecuali Fe (1 dan 5 m) dan Zn (5 mM) dan protease Isolat N3 hanya ion logam Fe (5 mM) yang bukan inhibitor sedangkan ion logam lainnya sebagai inhibitor. EDTA dapat menghambat protease isolat bakteri pencernaan ikan rawa. Analisis SDS-PAGE pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat G1 memiliki 3 pita dengan berat molekul 31, 37 dan 133 kD, isolat G3 memiliki 7 pita dengan berat molekul antara 19 - 133 kD dan isolat N3 memiliki 6 pita dengan berat molekul 19 - 127 kD. Analisis Zimogram pada protease ekstrak kasar didapatkan protease isolat G1 memiliki 1 pita dengan berat molekul 133 kD, isolat G3 memiliki 1 pita dengan berat molekul 126 kD dan isolat N3 juga memiliki 1 pita dengan berat molekul 116 kD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing XVI tahun 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K., Sillaiah, P., and Prasad, D.S. 2003. Production and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4:E56-64.
- Baehaki, A., Suhartono, M.T., dan Nurhayati, T. 2004. Karakterisasi Protease dari bakteri patogen ikan *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 8(2):60-72.
- Baehaki, A., Suhartono, M.T., Palupi, N.S., dan Nurhayati, T. 2008. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknol. dan Industri Pangan*, 19(1): 80-86.
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, and Graál M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol 2. Verlag Chemie., Weinheim.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive methodfor quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem*, 72:234-254.
- Choi, N.S., Yoon, K.S., Lee, J.Y., Han, K.Y., and Kim, S.H. 2001. Comparision of three substrates (casein, fibrin, and gelatin) in zimographic gel. *J. Biochim. Mol. Biol.* 34:531-536.
- Hames, B.D., and Hooper, N.M. 2000. *Biochemistry: The Instant Notes*, Ed.ke-2. Springer-Verlag., Hongkong.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Miyamoto, K., Tsujibo, H., Nukui, E., Itoh, H., Kaidzu, Y., and Inamori, Y. 2002. Isolation and characterization of the genes encoding two metalloproteases (MprI and MprII) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Biosci Biotechnol Biochem*. 66(2):416-21
- Muchtadi, D., Palupi, N.S., dan Astawan, M. 1996. *Enzim dalam Industri Pangan*. PAU Pangan dan Gizi IPB., Bogor.
- Olajuyigbe, F.M., and Ajele, J.O. 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* Lbb1-1 isolated from 'iru', a traditionally fermented African locust bean condiment. *Glob. J. Biotechnol. Biochem*. 3 (1): 42-46.
- Salyers, A.A., and D.D. Whitt. 1994. *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*. Departement of Microbiology University of Illinois. ASM Press., Washington D.C.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB-Depdikbud., Bogor.
- Wahyuntari, B., Suhartono, M.T., and Pyun, Y. 2000. Properties of extracellular protease from an extreme thermophilic microorganism isolated from Tangkupan Prahu crater. *Hayati*. 7(1): 6-10.