

**Isolasi Dan Produksi Kolagenase Dari Bakteri *Bacillus BE-1***  
**(Isolation and Production of Collagenase from *Bacillus BE-1*)**

**Ace Bahaki<sup>1)</sup>, Maggy T. Suhartono<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup> Program Studi Teknologi Hasil Perikanan

Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya

<sup>2)</sup> Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan

Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

**ABSTRACT**

The optimum production time was 25 for *Bacillus BE-1* with collagenase activity of 0.086 U/ml. When collagen was added to the Modified LB media (LB + Collagen) different responses was obtained. In this case, we reduced the nutrient content (carbon and nitrogen sources) of LB, such that the bacteria was encouraged to utilize more collagen substrate added into the media. After 15 hours in LB + collagen media, the activity of collagenase of *Bacillus BE-1* was increased from 0.086 U/ml to 0.094 U/ml. The Substrate spesificities in LB media showed collagenase from *Bacillus BE-1* was more active towards fibrin compare with the other 3 protein substrates (casein, collagen and gelatin). Addition of collagen in the media changed the substrate spesificities of the Collagenase. Collagenase from *Bacillus BE-1* became more active towards collagen even though casein remained the best substrate.

**Key Words:** Collagenase, *Bacillus BE-1*, spesificities

**PENDAHULUAN**

Kolagenase merupakan endopeptidase yang dapat memecah domain *triple helical* dari kolagen. Berdasarkan fungsi fisiologisnya, kolagenase digolongkan menjadi dua tipe, yaitu serin kolagenase dan metallocolagenase. Serin kolagenase terlihat pada produksi hormon dan farmakologi peptida aktif, sebagai fungsi seluler. Fungsi tersebut meliputi pencernaan protein, penggumpalan darah, fibrinolisis, aktivasi kompleks dan fertilisasi. Enzim tipe ini juga secara luas digunakan dalam industri kimia, industri obat, makanan dan eksperimen biologi molekuler. Sedangkan jenis metallocolagenase merupakan enzim yang mengandung Zn yang membutuhkan kalsium untuk kestabilan. Selain itu, metallocolagenase termasuk dalam enzim ekstraseluler yang terlibat dalam pembentukan kembali matriks ekstraseluler dengan berat molekul yang bervariasi dari 30 hingga 150 kDa. Jenis enzim ini telah banyak dipelajari dari berbagai jaringan mamalia, dari bakteri, dan bisa ular (Park *et al.* 2002).

Kolagenase mempunyai banyak manfaat dan diaplikasikan pada industri obat-obatan dan riset, salah satunya digunakan dalam hidrolisis protein. Semua protein akan menghasilkan asam-amino bila dihidrolisis, tetapi ada beberapa protein yang disamping menghasilkan asam amino juga menghasilkan molekul-molekul protein yang masih berikatan atau peptida (Bjarnason 2001).

Salah satu sumber enzim kolagenase adalah dari mikroba. Penelitian ekstraksi kolagenase dari bakteri sudah banyak dipublikasikan. Beberapa bakteri yang menghasilkan kolagenase adalah *Bacillus subtilis* FS-2 (Nagano & To 1999), *Bacillus subtilis* CN2 (Tran & Nagano 2002), *Bacillus* sp. MO-1 (Okamoto *et al.* 2001), *Bacillus subtilis* AS1.398 (Rui *et al.* 2009), *Bacillus pumilus* Col-J (Wu *et al.* 2010), *Sreptomyces* sp. Strain 3B (Petrova *et al.* 2006) dan *Sreptomyces parvulus* (Sakurai *et al.* 2009).

Bakteri yang berpotensi sebagai sumber kolagenase dan merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi Institut Pertanian Bogor adalah *Bacillus BE-1*. Untuk itu pada penelitian ini dilakukan isolasi dan produksi kolagenase dari bakteri *Bacillus BE-1*.

## BAHAN DAN METODE

### 2.1 Media Pertumbuhan dan Produksi

Media pertumbuhan yang digunakan ada dua yaitu media pertama adalah *Luria Bertani broth* (LB) yang komposisi: 1% triptone; 0,5% ekstrak khamir dan 1% NaCl. Media kedua adalah media LB + kolagen dengan komposisinya: 0,5% triptone; 0,25% ekstrak khamir; 1% NaCl dan kolagen 5%.

Proses produksi enzim diawali dengan penentuan umur prekultur (dalam media LB) yang tepat untuk keperluan produksi enzim. 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% kemudian ditambahkan pada media LB dan LB + kolagen yang baru sebagai media untuk memproduksi protease. Pengukuran nilai OD, aktivitas kolagenase dan kadar protein dilakukan setiap 5 jam selama 40 jam. Kondisi produksi adalah pH 7, suhu 37 °C, agitasi 120 rpm dan lama produksi 40 jam. Untuk memisahkan sel dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 700 x g selama 15 menit pada suhu 4 °C.

### 2.2 Pengukuran Aktivitas Kolagenase

Pengukuran aktivitas protease dilakukan menurut metode Bergmeyer *et al.* (1983). Prosedur pengujian aktivitas kolagenase menggunakan substrat kolagen dengan konsentrasi protein 0,54 mg/ml. Prosedurnya adalah: mereaksikan enzim sebanyak 50 µl dengan 250 µl substrat dan 250 µl 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 2.000 x g 10 menit. Dari campuran hasil sentrifugasi diambil supernatant dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 µmol produk tirozin per menit pada kondisi pengukuran.

### 2.3 Analisis Protein Enzim

Analisis konsentrasi protein enzim menggunakan metoda Bradford (1976). Ulangan pada analisis protein ini dilakukan tiga kali untuk menghasilkan data yang valid. Larutan Bradford dibuat dengan cara sebagai berikut: sebanyak 100 mg *coomassie brilliant blue* (CBB) G-250 dilarutkan dalam 50 ml ethanol 95 %. Setelah itu 100 ml asam fosfat 85 % ditambahkan. Terakhir larutan diencerkan hingga 1 liter. Larutan disaring dengan kertas saring. Larutan tersebut diencerkan 5 kali dengan aquades ketika akan digunakan. Larutan standar segar dibuat menggunakan protein BSA. Sebanyak 100 mg BSA ditimbang dan ditambahkan 25 ml aquades. Larutan kemudian dikocok pelan-pelan, setelah larut, diencerkan sampai 50 ml. Konsentrasi akhir larutan stock untuk standar ini adalah 2 mg/ml. Kemudian sederetan larutan standar dengan menggunakan larutan stock di atas dengan cara.

Setelah semua pereaksi siap, langkah selanjutnya adalah memipet masing-masing larutan dalam tiap tabung sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain yang bersih. Sebanyak 5 ml pereaksi Bradford ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Blanko 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.

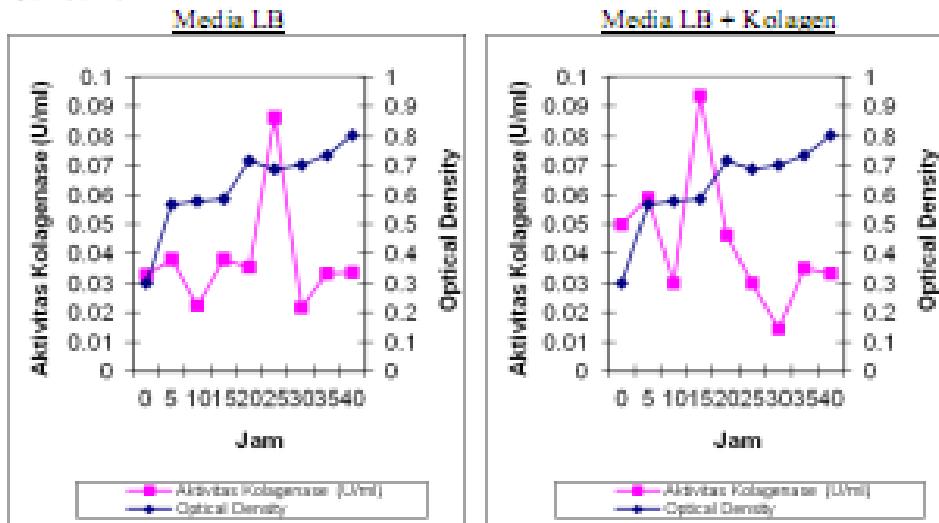
## 2.4 Spesifitas Substrat

Pengujian spesifitas substrat adalah untuk mengetahui daya hidrolisis enzim. Spesifitas substrat dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada substrat yang berbeda. Kolagenase direaksikan dengan beberapa jenis substrat yaitu musin, kolagen dari kulit ikan bandeng, gelatin komersil (Sigma), kasein hammerstein (Sigma) dan fibrin komersil (Sigma).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Produksi kolagenase

Produksi kolagenase dilakukan pada media *Luria bertani broth* (LB) dan media LB + kolagen. Pengamatan dilakukan setiap 5 jam sekali selama 40 jam, pada suhu 37 °C dan kecepatan 120 rpm. Enzim yang telah dihasilkan oleh bakteri dipisahkan dari sel bakteri menggunakan sentrifugasi. Dengan teknik ini, sel akan mengendap oleh adanya gaya gravitasi sedangkan enzim tetap terdapat pada supernatant. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah terjadinya kerusakan struktur enzim, selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas kolagenase, sedangkan pertumbuhan bakteri diamati melalui *optical density* (OD) pada  $\lambda = 620$  nm. Produksi protease pada media LB dan LB + kolagen dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 2. Aktivitas kolagenase *Bacillus* BE-1 pada media LB dan LB + kolagen

Pada Gambar 1 memperlihatkan waktu produksi optimum untuk *Bacillus* BE-1 pada media LB adalah pada jam ke-25 dengan aktivitas kolagenase 0,086 U/ml. Aktivitas kolagenase *Bacillus* BE-1 stabil dengan interval waktu yang panjang. Hubungan antara pola pertumbuhan sel bakteri dan aktivitas kolagenase menunjukkan *Bacillus* BE-1 dicapai pada saat pertumbuhan bakteri pada fase stasioner. Hasil penelitian yang dilaporkan menunjukkan bahwa fase pertumbuhan eksponensial adalah fase dimana terjadi sintesis dan sekresi awal protease, secara substansial meningkat pada fase akhir pertumbuhan dan mengalami produksi protease maksimum pada fase stasioner (Kumar dan Hiroshi 1999).

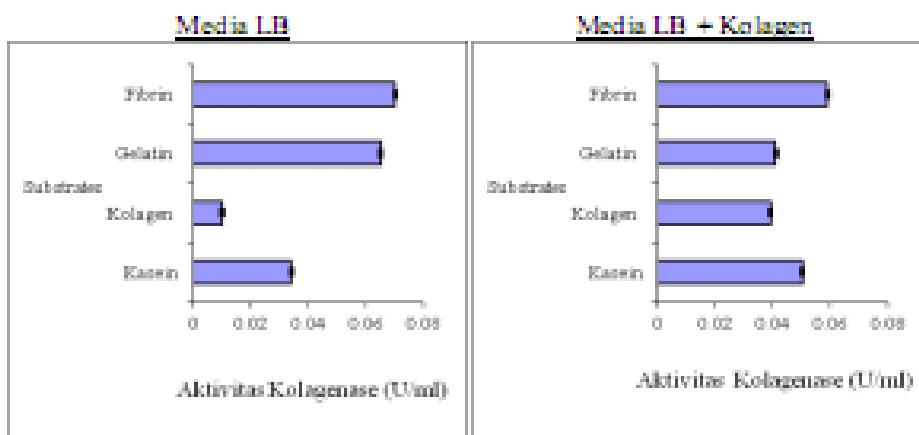
Produksi pada media LB + kolagen (Gambar 1) didapatkan respon yang berbeda. Pada kasus ini, dilakukan pengurangan kandungan nutrisi (sumber nitrogen dan karbon) dari LB, dengan demikian bakteria terdirung untuk memanfaatkan substrat kolagen yang ditambah ke media. Aktivitas kolagenase *Bacillus* BE-1 mengalami peningkatan dari 0,086 U/ml menjadi

0,094 U/ml. kolagenase *Bacillus BE-1* dengan aktivitas maksimum memiliki produksi optimum pada inkubasi ke-15.

Bakteri yang berbeda akan didapatkan waktu produksi enzim yang serupa. Akan tetapi, bakteri yang serupa akan memperlihatkan waktu produksi optimum enzim yang berbeda tergantung dari kondisi lingkungannya. *Bacillus subtilis CN2* memiliki waktu produksi optimal pada inkubasi jam ke-15 (Tran dan Nagano 2004). Waktu yang lebih singkat produksi protease optimumnya yaitu inkubasi selama 9 jam pada protease *Bacillus SMIA-2* (Nascimento dan Martins 2004). *Bacillus licheniformis Lbb1-11* dan *Bacillus subtilis PE-11* memproduksi protease secara optimal pada waktu yang lebih panjang dari pada yang telah dilaporkan dimana pada inkubasi jam ke-48 (Olajuyigbe dan Ajele 2008; Adinarayana *et al* 2003).

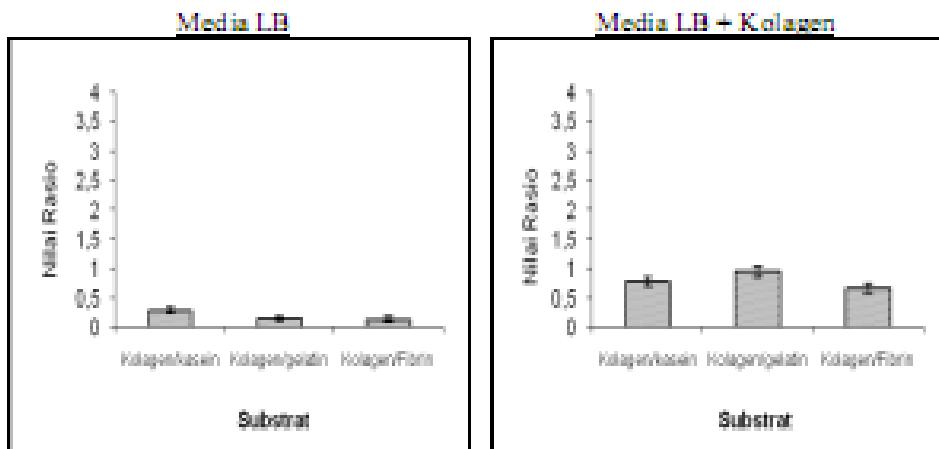
### 3.2 Spesifitas Substrat

Substrat yang digunakan adalah kasein, kolagen, gelatin dan fibrin. Hasil analisis proteolitik bakteri *Bacillus BE-1* pada media LB dan media LB + kolagen dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas kolagenase *Bacillus BE-1* pada dua tipe media: pada media *Luria Bertani* Broth dan LB + kolagen. Substrat digunakan pada konsentrasi 0,05%.

Pada Gambar 2 menunjukkan aktivitas kolagenase *Bacillus BE-1* pada substrat yang berbeda. Ketika diproduksi pada media LB, kolagenase *Bacillus BE-1* lebih aktif pada substrat fibrin. Terdapat perbedaan preferensi substrat dari protease *Bacillus BE-1*. Penambahan kolagen pada media menyebabkan terjadinya perubahan spesifitas substrat dari protease sehingga pola hidrolisis berbeda. protease *Bacillus BE-1* menjadi lebih aktif terhadap kolagen dan gelatin walaupun fibrin masih merupakan substrat yang terbaik. Hal ini dimungkinkan kolagenase dengan jenis yang berbeda disintesis oleh kedua isolat sebagai respon perubahan sumber protein yang ada atau tersedia pada media yang dapat mengubah sintesis fraksi protease dan spesifitasnya.



Gambar 3. Rasio hidrolisis kolagen dengan substrat lain (kasein, gelatin dan fibrin), protease *Bacillus BE-1* pada dua tipe media: pada media Luria Bertani Broth dan LB + kolagen.

Gambar 3 menunjukkan rasio hidrolisis kolagen dengan protein lain (kasein, gelatin dan fibrin). Rasio hidrolisis kolagen terhadap kasein pada protease *Bacillus BE-1* dengan media LB + kolagen lebih besar 2,7 kali dibandingkan dengan media LB, rasio hidrolisis kolagen terhadap gelatin dengan media LB + kolagen lebih besar 6,4 kali dibandingkan dengan media LB dan rasio hidrolisis kolagen terhadap fibrin pada media LB + kolagen juga lebih besar 4,7 kali dibandingkan pada media LB.

#### KESIMPULAN

Waktu produksi optimum untuk *Bacillus BE-1* pada media LB adalah pada jam ke-25 dengan aktivitas kolagenase 0,086 U/ml. Produksi pada media LB + kolagen didapatkan respon yang berbeda. Aktivitas kolagenase *Bacillus BE-1* mengalami peningkatan dari 0,086 U/ml menjadi 0,094 U/ml. kolagenase *Bacillus BE-1* dengan aktivitas maksimum memiliki produksi optimum pada inkubasi ke-15. Uji spesifitas substrat menunjukkan ketika di produksi pada media LB, kolagenase *Bacillus BE-1* lebih aktif pada substrat fibrin. Penambahan kolagen pada media menyebabkan terjadinya perubahan spesifitas substrat dari kolagenase sehingga pola hidrolisis berbeda. Kolagenase *Bacillus BE-1* menjadi lebih aktif terhadap kolagen dan gelatin walaupun fibrin masih merupakan substrat yang terbaik. Rasio hidrolisis kolagen terhadap kasein pada kolagenase *Bacillus BE-1* dengan media LB + kolagen lebih besar 2,7 kali dibandingkan dengan media LB, rasio hidrolisis kolagen terhadap gelatin dengan media LB + kolagen lebih besar 6,4 kali dibandingkan dengan media LB dan rasio hidrolisis kolagen terhadap fibrin pada media LB + kolagen juga lebih besar 4,7 kali dibandingkan pada media LB.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K, Sillaiah P, Prasad DS. 2003. Production and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech* 4:E56-E64.
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol 2. Weinheim: Verlag Chemie.
- Bjarnason JB. 2001. *Biotechnological Applications of Fish Offal in Iceland*. Science Institute. Island: University of Iceland.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72:234-254.
- Kumar CG, Hiroshi T. 1999. Microbial alkaline proteases: From a biindustrial viewpoint. *Biochimica Advances* 17: 561-594.
- Nagano H, To KA. 1999. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 181-183.
- Nascimento WCA, Martins MLL. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 35:91-96.
- Olajuyigbe FM, Ajele JO. 2008. Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* Lbl-1 isolated from 'iru', a traditionally fermented African locust bean condiment. *Glob J Biotechnol Biochem* 3: 42-46.
- Okamoto M, Yonejima Y, Tsujimoto Y, Suzuki Y, Watanabe K. 2001. A thermostable collagenolytic protease with very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1. *Appl Microb Biotech* 57: 103-108.
- Park PJ, Lee SH, Byun HG, Kim SH, Kim SK. 2002. Purification and characterization of a collagenase from the Mackarel, *Scomber japonicus*. *J Biochem Mol Bio* 35: 576-582.
- Petrova D, Derekova A, Vlahov S. 2006. Purification and properties of individual collagenases from *Streptomyces* sp Strain 3B. *Folia Microbiol* 51: 93-98.
- Riu R, Zhiqiang L, Min C. 2009. Isolation and purification of caseinase and collagenase from commercial *bacillus subtilis* usl-398 enzyme by affinity chromatography. *J Soc Leather Tech Chem* 93: 8-11.
- Sakurai Y, Inoue H, Nishii W, Takahashi T, Lino Y, Yamamoto M, Takahashi K. 2009. Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 21-28.
- Tran IH, Nagano H. 2002. Isolation and characteristic of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. *J Food Sci* 67: 1184-1187.
- Wu Q, Li C, Li C, Chen H, Shuliang L. 2010. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-1. *Appl Biochem Biotechnol* 160:129-139.