

## Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15

### *Isolation and characterization of protease from Bacillus subtilis 1012M15*

ELFI SUSANTI VH

Program Studi Kimia Jurusan PMIPA FKIP Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126

Diterima: 24 September 2002. Disetujui: 25 Desember 2002

#### ABSTRACT

A local strain of *Bacillus* sp. BAC4, is known to produce penicillin G acylase (PGA) enzyme with relatively high activity. This strain secretes the PGA into the culture medium. However, it has been reported that PGA activity fall and rise during culture, and the activity plummets during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , which probably due to usage protease activity of *Bacillus* sp. BAC4. To study the possible use of *Bacillus subtilis* 1012M15 as a host cell for cloning the *pga* gene from *Bacillus* sp. BAC4, the protease activity of *Bacillus subtilis* 1012M15 were studied. Protease activity was determined by Horikoshi method. In this experiment, maximum protease activity in *Bacillus subtilis* 1012M15 culture was observed after 8 hours. At this optimum condition, protease activity of *Bacillus* sp. BAC4 is five time higher than that of *Bacillus subtilis* 1012M15. This situation promised the possible usage of *Bacillus subtilis* 1012M15 as a host cell for *pga* expression. For protease characterization, the bacterial culture had been separated from the cell debris by centrifugation. The filtrate was concentrated by freeze drying, fractionated by ammonium sulphate, dialyzed in selovan tube, and then fractionated by ion exchange chromatography employing DEAE-cellulose. The five peaks resulted indicated the presence of five protease. Based on inhibitor and activator influence analysis, it could be concluded that proteases from *Bacillus subtilis* 1012M15 contained of serin protease as well as metalloprotease and serin protease mixture.

© 2003 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** protease, penicillin G acylase, cloning, host cell.

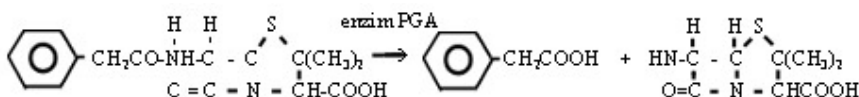
#### PENDAHULUAN

Infeksi bakteri merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia. Banyak mikroorganisme patogen yang ditemukan menjadi resisten terhadap berbagai antibiotika. Oleh karena itu dibutuhkan antibiotika baru yang dapat menyerang mikroorganisme patogen tersebut. Salah satu antibiotika yang dikembangkan adalah penisilin. Penisilin pertama kali ditemukan oleh Alexander Fleming pada tahun 1929 dari *Penicillium notatum*. Berbagai turunan penisilin telah berhasil dibuat dan digunakan orang.

Strain *Penicillium* digunakan pertama kali dalam produksi penisilin F. Dalam perkembangan selanjutnya ternyata yang banyak digunakan dan merupakan penisilin paling aktif adalah penisilin G. Dalam industri penisilin G dihidrolisis secara enzimatik oleh *penicillin G acylase* (PGA) dan menghasilkan asam 6-amino penisilinat (6-APA)(Gambar 1.), senyawa antara dalam produksi penisilin semisintetik, diantaranya metilsilin, kloksasilin, ampisilin dan karbenisilin.

Secara komersial, enzim PGA umumnya diproduksi oleh *E. coli* secara intrasel, sehingga sel-sel *E. coli* harus dilisis untuk mengisolasi dan memurnikan enzim. Strain lokal *Bacillus* sp. BAC4 memiliki kemampuan untuk memproduksi PGA dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan *E. coli* B130. Di samping itu *Bacillus* sp. BAC4 mensekresikan enzim PGA ke dalam kultur medium, sehingga lebih menguntungkan untuk produksi PGA. Hasil eksperimen yang telah diperoleh oleh para peneliti terdahulu menjelaskan bahwa aktivitas PGA dalam kultur cepat hilang selama penyimpanan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Hal ini diduga karena adanya protease *Bacillus* sp. BAC4 yang mampu menghidrolisis enzim PGA.

*Bacillus subtilis* 1012M15 diketahui memproduksi protease dalam jumlah yang lebih sedikit dengan aktivitas yang relatif rendah dibandingkan bakteri lain. Strain ini mulai banyak digunakan sebagai sel inang dalam kloning gen dari bakteri gram positif. Gen yang mengkode *penicillin V acylase* dari *Bacillus sphaericus* telah berhasil diekspresikan dalam *B. subtilis* (Kang et al., 1991). Ekspresi gen *penicillin G acylase* dari *Bacillus megaterium* ATCC14945 dalam dalam *B. subtilis* juga telah dilakukan (Olsson et al., 1985).



**Gambar 1.** Pemutusan enzimatik penisilin G menjadi asam 6-amino penisilinat.

Peningkatan aktivitas enzim PGA dapat dilakukan melalui beberapa pendekatan, diantaranya adalah dengan mentransfer gen *pga* dalam suatu inang yang kemudian dapat mengekspresikan gen tersebut dengan baik. Untuk itu dibutuhkan suatu bakteri yang dapat dijadikan sebagai sel inang yang memiliki aktivitas protease relatif rendah. Bakteri tersebut sebaiknya juga merupakan bakteri gram positif, supaya ekspresi gen *pga* terjadi secara eksternal (Priest, 1984).

Species *Bacillus* sangat cocok untuk produksi enzim, kecuali *B. cereus* dan *B. anthracis*. Mikroba jenis *Bacillus* tidak menghasilkan toksin, mudah ditumbuhkan, dan tidak memerlukan substrat yang mahal. Kemampuan *Bacillus* untuk bertahan pada temperatur tinggi, tidak adanya hasil samping metabolik, dan kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah besar protein ekstrasel membuat *Bacillus* merupakan organisme favorit untuk industri. Saat ini *B. subtilis* dipakai sebagai organisme inang untuk studi DNA-rekombinan (Doi *et al.*, 1992).

Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme (Rao *et al.*, 1998). Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease dibatasi oleh tersedianya tanah untuk penanaman dan kondisi yang cocok untuk pertumbuhan. Disamping itu proses produksi protease dari tumbuhan sangat memakan waktu. Protease tumbuhan yang dikenal antara lain papain, bromelain, dan keratinase. Protease hewan yang paling dikenal adalah tripsin, kimotripsin, pepsin dan rennin. Enzim-enzim ini dapat diperoleh dalam keadaan murni dengan jumlah besar (Boyer, 1971).

Penggunaan mikroorganisme sebagai sumber enzim protease dan kemungkinannya untuk melakukan manipulasi genetik, menjadikan protease mikroba lebih banyak dikembangkan. Banyak protease komersial, baik itu netral maupun alkalin, dihasilkan oleh *Bacillus*. Protease netral dari bakteri mampu aktif pada pH 5-8 dan memiliki toleransi suhu yang relatif rendah. Neutrase, suatu protease netral banyak digunakan pada proses hidrolisis protein makanan dalam industri makanan dengan derajat hidrolisis yang rendah. Beberapa protease netral termasuk jenis protease logam dan membutuhkan ion logam divalen untuk aktivitasnya. Sebagian lagi termasuk protease serin, tidak membutuhkan ion logam dalam aktivitasnya. Protease alkalin dari bakteri memiliki aktivitas tertinggi pada pH 10 dan temperatur optimal pada suhu 60°C. Sifat-sifat yang dimiliki protease ini membuatnya cocok untuk digunakan dalam industri detergen.

Jamur merupakan sumber penghasil enzim protease selain bakteri. Contohnya *Aspergillus oryzae* yang menghasilkan protease asam, netral maupun alkalin. Protease dari jamur mampu aktif pada rentang pH yang luas yaitu pH 4-11. Walaupun demikian, protease ini memiliki toleransi panas yang rendah dibandingkan protease bakteri. Protease

asam dari jamur memiliki pH optimal antara 4-5 dan stabil antara pH 2,5-6. Protease jenis ini banyak digunakan dalam industri pembuatan keju.

Protease netral jamur merupakan protease logam yang aktif pada pH 7 dan dihambat oleh zat pembentuk khelat. Protease ini menghidrolisis ikatan peptida pada asam amino hidrofobik, dan biasanya digunakan untuk mengurangi kepahitan makanan pada industri makanan. Protease virus memiliki beberapa keuntungan dibandingkan protease lain, yaitu dalam fungsinya sebagai obat penyakit seperti kanker dan AIDS. Protease virus yang ditemukan termasuk jenis protease serin, aspartat dan sistein. (Rao, *et al.*, 1998).

Dalam penelitian ini protease yang dihasilkan *B. subtilis* 1012M15 akan diisolasi, dimurnikan dan dikarakterisasi, meliputi penentuan aktivitas spesifik, berat molekul dan jenis protease. Protease diisolasi dari kultur medium, proses pemurnian dilakukan melalui tahap *freeze drying*, fraksinasi dengan amonium sulfat, dialisis dan kromatografi penukar ion. Berat molekul protease ditentukan secara elektroforesis gel poliakrilamida, sedangkan jenis protease ditentukan dengan melihat pengaruh inhibitor dan aktivator terhadap aktivitas enzim.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari kemungkinan kloning dan ekspresi gen *pga* dari *Bacillus sp.* BAC4 ke dalam *B. subtilis* 1012M15, dan sekaligus menentukan jenis protease dari *B. subtilis* 1012M15. Bila aktivitas protease dari *B. subtilis* 1012M15 cukup rendah, maka diharapkan enzim PGA yang dihasilkan oleh klon rekombinan dalam *B. subtilis* 1012M15 adalah cukup stabil sehingga dapat diisolasi dengan relatif mudah dari media kultur.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Mikroorganisme yang digunakan yaitu *Bacillus sp.* BAC4, *B. subtilis* 1012M15, diperoleh dari Laboratorium Rekayasa Genetika PAU ITB Bandung. Medium yang digunakan yaitu medium LB (*Luria Bertani medium*) padat dan cair.

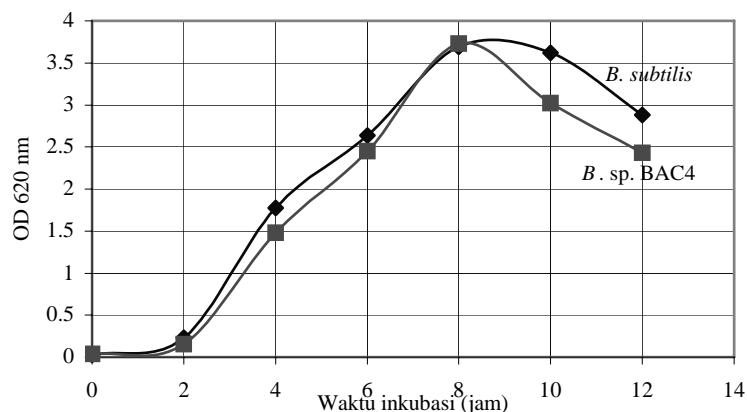
### Uji kualitatif protease

Uji ini dilakukan untuk menentukan kemampuan *B. subtilis* 1012M15 dalam mensekresikan enzim protease yang dapat mendegradasi protein. Dalam uji ini pada medium disertakan susu skim yang mengandung kasein. Kasein merupakan protein utama susu, suatu makromolekul yang tersusun atas subunit asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Kasein berfungsi sebagai substrat bagi enzim protease.

### Uji kuantitatif protease

Uji kuantitatif protease dilakukan untuk mengetahui kadar dan aktivitas protease dalam *B. subtilis* 1012M15, terdiri dari beberapa tahap, yaitu:

- (i) Pembuatan biakan bakteri yang steril dan inokulum aktif diperoleh dari biakan tersebut. Medium pertumbuhan yang digunakan yaitu medium Horikoshi yang telah dimodifikasi.
- (ii) Pembuatan kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas protease.
- (iii) Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengukur turbiditas atau kekeruhan suspensi medium sel yang kini merupakan inokulum aktif pada panjang gelombang 620 nm. Pengukuran dilakukan setiap selang waktu 2 jam selama 12 jam. Sedangkan aktivitas protease ditentukan dengan metode Horikoshi dan penentuan kadar protein dengan metode Lowry.



**Gambar 2.** Perbandingan pertumbuhan sel *Bacillus sp.* BAC4 dan *Bacillus subtilis* 1012M15.

### Karakterisasi protease

Protease yang dihasilkan bakteri *B. subtilis* tersebut akan diisolasi, dimurnikan dan dikarakterisasi, meliputi penentuan aktivitas spesifik, berat molekul dan jenis protease. Protease diisolasi dari kultur medium, proses pemurnian dilakukan melalui tahap *freeze drying*, fraksinasi dengan amonium sulfat, dialisis dan kromatografi penukar ion. Berat molekul protease ditentukan secara elektroforesis gel poliakrilamida, sedangkan jenis protease ditentukan dengan melihat pengaruh inhibitor dan aktivator terhadap aktivitas enzim. *Freeze drying* merupakan tahap pemekatan atau pengeringan larutan protein untuk mencegah denaturasi protein. Volume enzim yang digunakan adalah  $\frac{1}{4}$  dari volume wadah tempat penguapan yang digunakan.

Proses pengendapan protein dari larutannya menggunakan amonium sulfat dilakukan setelah ekstrak kasar protease dipekatkan melalui *freeze drying*. Pengendapan ini terjadi karena garam yang tersolvasi cenderung mengurangi molekul air pada bagian permukaan hidrofob protein, selanjutnya berinteraksi satu sama lainnya membentuk agregat. Molekul protein dengan berat molekul besar memerlukan konsentrasi garam yang kecil untuk membentuk endapan dan akan mengendap lebih dulu.

Proses dialisis berlangsung berdasarkan sifat semipermeabel membran, dimana molekul besar protein akan bertahan sedangkan molekul kecil dapat lolos melalui pori membran dan larut dalam sistem pelarut dialisis yang digunakan. Proses dialisis dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi zat terlarut di kedua sisi membran. Dengan demikian selalu diikuti pergantian bufer selama dialisis dan pengadukan sampai terjadi keseimbangan. Untuk menjaga stabilitas protein, dialisis dilakukan pada suhu 4-8°C.

Penentuan berat molekul protease dilakukan dengan Elektroforesis gel poliakrilamida. Sebagai standar protein digunakan *cytochrome C* (BM 12.400), *carbonic anhidrase* (BM 29.000), *albumin* (BM 66.000), dan *alcohol dehydrogenase* (BM 150.000).

Penggolongan protease ditentukan berdasarkan posisi pemotongan rantai polipeptida, pH optimum aktivitas enzim, dan jenis residu asam amino yang terdapat pada pusat aktif. Untuk mengetahui jenis gugus yang terdapat pada sisi aktif enzim dapat digunakan reaksi spesifik dengan inhibitor atau aktivator tertentu, yaitu etilen diamin tetra asetat (EDTA) sebagai inhibitor protease logam, *phenil methyl sulfonil fluorida* (PMSF) sebagai inhibitor protease serin, kalsium khlorida sebagai aktivator protease logam.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

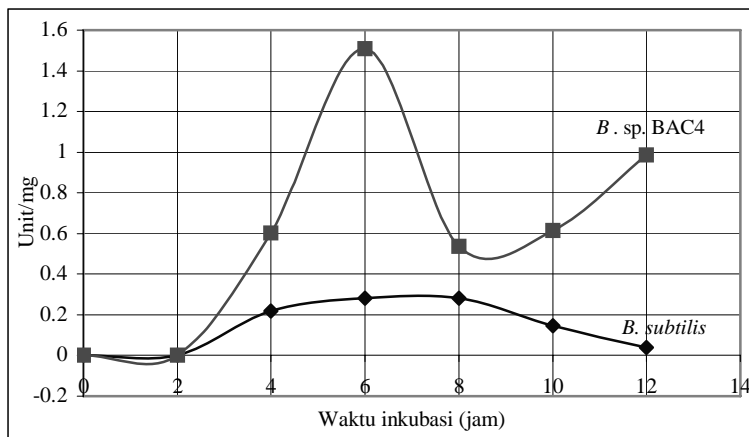
### Uji kualitatif protease

Susu skim mengandung kasein yang disertakan ke dalam medium pertumbuhan bakteri berfungsi sebagai substrat enzim. Hidrolisis kasein digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease. Protease mengkatalisis degradasi kasein yaitu dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air ke dalam molekul. Reaksi tersebut melepaskan asam amino.

Susu skim tersuspensi dalam medium. Setelah inokulasi dan inkubasi kultur *plate agar*, bakteri mensekresikan protease. Hal ini diperlihatkan dengan adanya daerah bening di sekeliling pertumbuhan bakteri. Luasnya daerah bening di sekeliling pertumbuhan bakteri tidak mewakili jumlah protease yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme. Karena daerah bening yang dihasilkan akan bertambah dengan bertambahnya waktu inkubasi. Untuk itu, kandungan protease dalam kedua bakteri, *B. subtilis* 1012M15 dan *Bacillus sp.* BAC4, perlu ditentukan secara kuantitatif.

### Pertumbuhan sel bakteri

Pengukuran kekeruhan medium pada selang waktu tertentu dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri memperbanyak sel dalam medium. Data-data yang diperoleh dibuat kurva pertumbuhan (Gambar 2). Kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh,



**Gambar 3.** Aktivitas protease *Bacillus sp. BAC4* dan *B. subtilis* 1012M15

berkembang, memperbanyak diri dan mensekresikan enzim ke medium kultur. Kekeruhan tersebut diukur dengan mengukur turbiditas medium pada panjang gelombang 620 nm. Turbiditas yang terukur ini tidak hanya mengukur jumlah sel yang hidup, tetapi sel yang mati juga ikut terukur.

Dari kurva pertumbuhan pada Gambar 3 terlihat bahwa kerapatan optik kultur medium sampai jam ke dua belum menunjukkan kenaikan. Fase ini merupakan fase adaptasi bagi bakteri terhadap lingkungan pertumbuhan untuk mensekresikan enzim-enzim ekstrasel yang akan menghidrolisis komponen medium yang diperlukan untuk metabolisme dan pertumbuhan sel. Setelah jam ke dua bakteri mulai tumbuh dengan cepat, ditunjukkan dengan meningkatnya nilai kerapatan optik medium sampai jam ke delapan. Hal itu terjadi pada kedua bakteri, *B. subtilis* 1012M15 dan *Bacillus sp. BAC4*. Kerapatan optik tertinggi dicapai setelah 8 jam untuk kedua basilus (*B. subtilis* 1012M15 dan *Bacillus sp. BAC4*). Pada saat itu dianggap sel mengalami pertumbuhan maksimal.

Kerapatan optik menurun setelah jam ke delapan. Pada fase ini bakteri mulai memasuki fase kematian. Kematian ini terjadi karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah bertumpuk dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya. *Bacillus sp. BAC4* memasuki fase kematian lebih cepat dari pada *B. subtilis* 1012M15.

#### Penentuan aktivitas protease selama pertumbuhan

Aktivitas protease ditentukan dengan metode Horikoshi. Pada metode ini kasein digunakan sebagai substrat. Enzim protease yang disekresi oleh sel bakteri akan menghidrolisis kasein untuk menghasilkan asam amino. Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein, dan dilakukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 275 nm. Panjang gelombang 275 nm ini merupakan panjang gelombang maksimum untuk penyerapan sinar UV oleh protein yang mengandung residu asam

amino aromatik (misalnya tirosin dan triptopan). 1 unit aktivitas protease dinyatakan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan material yang larut dalam campuran TCA, yang ekuivalen dengan 1  $\mu\text{mol}$  tirosin dari larutan kasein 1% (b/v) permenit pada pH 8,0 dan suhu 37°C.

Kadar protein total dalam larutan enzim ditentukan dengan metode Lowry. Pada metode ini digunakan reagen folin ciocalteau yang akan bereaksi dengan protein dan memberikan warna biru gelap yang kuat. Jumlah protein ditentukan berdasarkan serapan larutan tersebut pada panjang gelombang 750 nm.

Dari data diperlihatkan bahwa *B. subtilis* 1012M15 dan *Bacillus sp. BAC4* aktif menghasilkan protease selama pertumbuhannya. Walaupun demikian protease yang dihasilkan *Bacillus sp. BAC4* tidak stabil, hal ini ditunjukkan dengan terjadinya kenaikan dan penurunan aktivitas protease selama pertumbuhan.

Puncak aktivitas protease *B. subtilis* 1012M15 dan *Bacillus sp. BAC4* dicapai setelah fermentasi 6 jam, terjadi ketika sel mengalami masa pertumbuhan yang meningkat, dimana semakin banyak sel, semakin banyak protease ekstrasel yang dihasilkan (Gambar 3). Kenyataan ini sedikit berbeda dengan hasil yang diperoleh Kole dkk bahwa produksi protease ekstrasel tertinggi terjadi selama fase pertumbuhan pasca eksponensial dan stasioner *B. subtilis* strain NCIB8054.

Aktivitas protease *Bacillus sp. BAC4* lebih besar dari yang dihasilkan oleh *B. subtilis* 1012M15. Pada jam ke 6 aktivitas protease *Bacillus sp. BAC4* mencapai 5 kali aktivitas protease *B. subtilis* 1012M15. Kondisi ini memberikan gambaran kemungkinan dapat digunakannya *B. subtilis* 1012M15 sebagai *host* untuk ekspresi gen *pga* guna produksi enzim penisilin G asilase.

#### Isolasi dan pemurnian protease

Protease ekstrasel *B. subtilis* 1012M15 diisolasi dari medium yang mempunyai komposisi sama dengan medium pertumbuhan setelah fermentasi selama 6 jam. Enzim ekstrasel dalam medium dipisahkan dari selnya dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm menggunakan rotor jenis JA 21. Enzim ini akan berada di supernatannya dan merupakan ekstrak kasar protease. Pengukuran aktivitas protease dilakukan terhadap supernatan tersebut dengan metode Horikoshi, sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry.

Dari hasil pengukuran diperoleh bahwa *B. subtilis* 1012M15 mempunyai aktivitas protease 0,95 unit/mL. Kadar protein total 4,75 mg/mL dan aktivitas spesifik 0,2 unit/mg. Terhadap ekstrak kasar protease dilakukan pemekatan yaitu dengan cara *freeze drying*.

### Freeze drying

*Freeze drying* merupakan proses pemekatan larutan protein dalam keadaan dingin untuk mencegah terjadinya denaturasi. Larutan yang mengandung protease dari *B. subtilis* 1012M15 sebanyak 174 mL dibekukan dalam *freeze r* dan ditempatkan pada *freeze dryer*. Setelah *freeze drying* dilakukan selama 24 jam diperoleh larutan yang pekat sebanyak 25 mL. Terhadap hasil pemekatan ini ditentukan aktivitas protease dan kadar protein total dengan cara yang sama seperti di atas, dengan nilai masing-masing 2,356 unit/mL dan 22,825 mg/mL, dengan aktivitas spesifik 0,103 unit/mg.

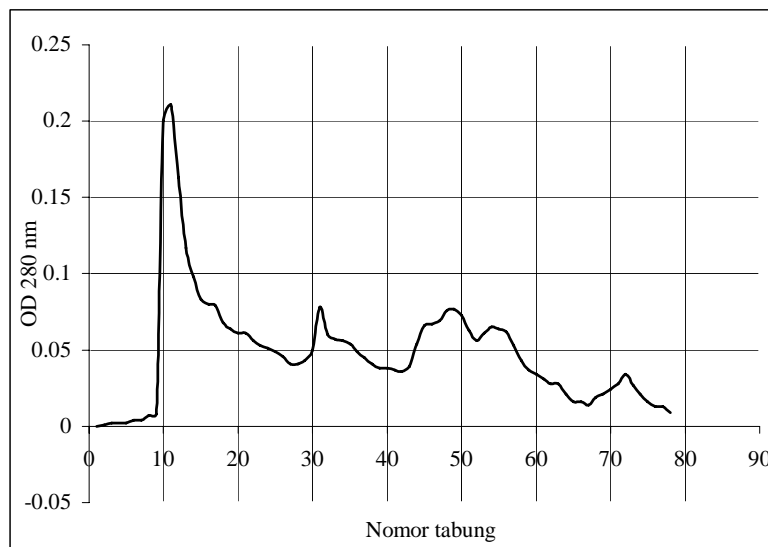
Dari hasil pengukuran tersebut terlihat bahwa kadar protein dari *B. subtilis* 1012M15 setelah pemekatan 10 kali mengalami kenaikan 4,8 kali dari keadaan semula. Walaupun demikian aktivitasnya mengalami penurunan, diduga selama proses *freeze drying* terjadi perubahan konformasi protein yang mengakibatkan sisi aktif enzim berubah, dan menurunkan aktivitas enzim. Pemurnian lebih lanjut dilakukan fraksinasi dengan amonium sulfat yang akan mengendapkan partikel protein.

### Fraksinasi dengan amonium sulfat

Pemisahan menggunakan amonium sulfat didasarkan pada efek *salting out*, yaitu amonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein sehingga ia akan mengendap. Konsentrasi amonium sulfat dari 0 hingga 80% (b/v) ditambahkan sedikit demi sedikit ke larutan protein pada suhu 4°C. Sebanyak 15 mL larutan hasil pemekatan yang mengandung protease dari *B. subtilis* 1012M15 digunakan untuk proses ini. Pengendapan terjadi secara perlahan dan disetimbangkan selama 12 jam. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan cara sentrifugasi, dan diperoleh endapan protein sebanyak 0,56 gram. Endapan tersebut mempunyai aktivitas protease 8,67 unit/mL, dengan kadar protein 17,525 mg/mL dan aktivitas spesifik 0,495 unit/mg. Kadar protein mengalami penurunan, karena protein pengotor telah terpisah, dan diharapkan protease yang diperoleh lebih baik. Hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya aktivitas protease. Untuk menghilangkan sisa-sisa garam amonium sulfat dan molekul-molekul kecil lainnya, maka endapan yang diperoleh didialisis menggunakan tabung selovan.

### Dialisis

Dialisis dilakukan menggunakan tabung selovan yang bersifat semipermeabel. Molekul besar protein tertahan dalam membran, sedangkan molekul kecil dapat lolos keluar melalui pori membran dan larut dalam pelarut yang digunakan. Dialisis dilakukan selama 24 jam dengan dua kali pergantian bufer



**Gambar 4.** Kromatogram penukar ion terhadap larutan protease dari *B. subtilis* 1012M15.

dialisis, pada suhu 4°C untuk menjaga stabilitas enzim. Pelarut yang digunakan adalah buffer tris-Cl 0,05 M pH 8,0. Setelah dialisis, larutan enzim dari *B. subtilis* 1012M15 mempunyai aktivitas protease 1,04 unit/mL dengan kadar protein 8,45 mg/mL dan aktivitas spesifik 0,123 unit/mg. Terlihat bahwa terjadi penurunan kadar protein dan aktivitas protease. Penurunan kadar protein terjadi karena molekul protein kecil telah keluar melalui membran selama dialisis. Diduga telah terjadi denaturasi pada struktur enzim selama proses dialisis, yang menyebabkan aktivitas enzim menjadi turun. Disamping itu diketahui bahwa enzim protease ini memang tidak stabil. Terhadap hasil dialisis dilakukan pemurnian lebih lanjut, yaitu dengan kromatografi penukar ion menggunakan matriks DEAE-selulosa.

### Kromatografi penukar ion

Pemisahan dalam kromatografi penukar ion tergantung pada keseimbangan adsorpsi dari molekul bermuatan dengan gugus penukar ion yang bermuatan berlawanan. Prinsip kerja metode ini adalah memisahkan protein berdasarkan pertukaran *counter ion* oleh berbagai protein yang bermuatan sejenis. Proses elusi dilakukan secara gradien dengan variasi konsentrasi NaCl dengan kecepatan elusi 0,37 mL/menit. Eluat yang diperoleh setelah proses elusi di kumpulkan dengan *fraction collector* setiap 3 mL, dan diukur kadar proteinnya dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 280 nm (Gambar 4). Fraksi-fraksi yang mempunyai nilai serapan yang membentuk satu puncak diperkirakan masuk dalam satu jenis protease, dikumpulkan dalam satu fraksi dan diukur aktivitas proteasenya (Tabel 1.).

Dari tabel terlihat bahwa aktivitas protease tertinggi dicapai pada Puncak III dengan aktivitas spesifik 50,867 unit/mg. Puncak yang pertama keluar merupakan enzim yang terikat paling lemah, dan mempunyai aktivitas spesifik terendah. Puncak paling

akhir merupakan enzim yang terikat kuat pada matriks yang bermuatan positif. Jika ditinjau dari penggunaan eluen yang memiliki pH 8, maka enzim tersebut memiliki muatan total negatif. Dari hasil kromatografi ini kita belum bisa menentukan jenis protease yang terdapat pada kedua bakteri. Untuk itu maka dilihat pengaruh inhibitor dan aktivator terhadap aktivitas enzim.

**Tabel 1.** Pengumpulan fraksi-fraksi eluat hasil kromatografi kolom *B. subtilis* 1012M15, dan aktivitas protease dalam fraksi-fraksi eluat kromatografi kolom tersebut.

Puncak	Fraksi No.	Protein total mg/mL	Aktivitas Unit/mL	Aktivitas Spesifik Unit/mg
I	09-18	0,644	0,987	1,532
II	34-38	0,037	0,550	14,865
III	42-50	0,015	0,763	50,867
IV	55-59	0,0137	0,675	49,270
V	67-69	0,0587	0,487	8,296

#### Penentuan golongan protease

Penentuan golongan protease dilakukan dengan melihat pengaruh inhibitor dan aktivator terhadap aktivitas enzim. Inhibitor dan aktivator yang dipakai adalah PMSF, EDTA dan  $\text{CaCl}_2$ . PMSF (*phenil methyl sulfonil florida*) akan terikat ke residu serin pada pusat aktif suatu enzim dengan mengubah serin tersebut menjadi derivat *phenil methyl sulfonil*, yang menyebabkan penurunan aktivitas katalitik enzim. Ion  $\text{Ca}^{+2}$  merupakan modulator positif yang menyebabkan perubahan konformasi sisi katalitik enzim, yang akan mempermudah interaksi dengan substrat sehingga meningkatkan aktivitas katalitik enzim. EDTA merupakan senyawa pengkhelat ion logam pada protease logam, yang menyebabkan penurunan aktivitas katalitik enzim. Dari kelima puncak yang dihasilkan dalam kromatografi penukar ion DEAE selulosa, dianalisa tiga puncak yang memiliki aktivitas terbesar (Tabel 2).

**Tabel 2.** Pengaruh inhibitor dan aktivator terhadap aktivitas protease setiap puncak.

Senyawa 1 mM	<i>B. subtilis</i> 1012M15 (%)		
	II	III	IV
PMSF	-22,7	-37,7	-27,7
EDTA	+22	-19	+40
$\text{CaCl}_2$	-34	-93	-68,7

Keterangan: - = inhibisi, + = aktivasi

Pada *B. subtilis* 1012M15, protease II dan IV hanya dihambat oleh PMSF dan tidak oleh EDTA. Hal ini menunjukkan bahwa protease tersebut termasuk pada golongan protease serin. Sedangkan protease III merupakan campuran protease serin dan logam dengan perbandingan 1,98: 1.  $\text{CaCl}_2$  memberi pengaruh terhadap aktivitas enzim, hal ini terlihat bahwa terjadi penurunan aktivitas enzim pada ke tiga protease tersebut, masing-masing sebesar 34%, 93%, dan 68,7%.

#### Elektroforesis gel poliakrilamida

Elektroforesis gel poliakrilamida dilakukan tidak hanya untuk memisahkan sejumlah besar spesies makromolekul, tetapi juga untuk mengkarakterisasi massa molekul relatif makromolekul tersebut. Gel elektroforesis memberikan lebih dari satu pita, hal ini menunjukkan bahwa enzim tersebut merupakan campuran protein yang ukurannya berbeda.

## KESIMPULAN

Aktivitas protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15 relatif rendah, dan ini memberikan kemungkinan penggunaan *B. subtilis* 1012M15 sebagai sel inang untuk ekspresi gen *pga* (*penicillin G acylase*). Protease dari *B. subtilis* 1012M15 terdiri dari protease serin dan campuran protease serin dan logam dengan perbandingan 1,98:1. Untuk mendapatkan protease yang lebih murni maka disarankan untuk memisahkan protease dengan metode lain, sehingga protease dapat dikarakterisasi dengan lebih tepat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Boyer, P. D. 1971. *The Enzymes*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Academic Press. Inc.
- Doi, R.H. and M. Martina. 1992. *Biology of Bacilli*. Stoneham: Butterworth-Heinemann.
- Hammond, S., M. Peter, and A. Lambert. 1978. *Antibiotics and Antimicrobial Action*. New York: Edward Arnold.
- Heftmann, E. 1992. *Chromatography, Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods*. 5<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V.
- Kang, J. H, Y. Hwang, and O.J. Yoo. 1991. Expression of the Penicillin G Acylase Gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology* 17, 99-108.
- Mathews, K.C, K.E. Van Hodle. 1996. *Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Medgyeti, G. A, and Verczkey L. 1980. *Electroforesis in the Separation of Biological Macromolecules*. Budapest: Akademiai Kiado.
- Meevotism, V. and J.R. Saunders. 1987. Cloning and expression of the penicillin acylase genes from overproducing strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 25: 372-378.
- Olsson A., T. Hagstrom, B. Nilsson, M. Uhlen, and S. Gatenbeck. 1985. Molecular cloning of *Bacillus sphaericus* penicillin V amidase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology* 1084-1089.
- Priest, F.G., 1984. *Extracellular Enzymes*. London: Van Nostrand Reinhold Co. Ltd.
- Rao, M.B, M.T Aparna, S.G. Mohini and V.D. Vasanti. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 597-635.
- Scopes, R.K., 1982. *Protein Purification-Principles and Practice*. New York: Springer-Verlag.
- Stryer, L. 1992. *Biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. New York: W. H. Freeman and Co.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press.