

ISSN 1858-4276

Biospectrum

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

Volume 1 Nomor 1, Juni 2005

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas

J. Biospectrum	Vol. 1	No. 1	Hal. 1-66	Padang Juni 2005	ISSN 1858-4276
----------------	--------	-------	-----------	---------------------	-------------------

- Muslim, Rapidah, H. Gustian & Mansyurdin. - Penggandaan kromosom dan pengaruhnya terhadap fenotip dan fertilitas bengkuang (*Pachyrrhizus erosus* L.)..... 1
- Noli, Z. A. - Respon tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens.) terhadap inokulasi beberapa galur *Agrobacterium rhizogenes* dalam membentuk akar rambut7
- Noli, Z. A. - Pertumbuhan akar rambut kina (*Cinchona succirubra* Pavon ex Klotzsch.) hasil transformasi *Agrobacterium rhizogenes* galur LBA 9457 pada medium dengan penambahan beberapa konsentrasi sukrosa dan kasein hidrolisat13
- Alamsyah, F., A. Agustien & F. Famelia. - Pengaruh beberapa logam terhadap aktivitas enzim protease dari *Bacillus brevis* MB 6 pada medium fermentasi limbah cair tahu.....19
- Rahayu, R., I. Abbas & Dahelmi. - Pengaruh ekstrak daun surian (*Toona sureni* Merr.) terhadap periode larva dan pertambahan berat badan *Epilachna septima* Dieke.....25
- Dawair, Z., Suwirmen & D. Ferina. - Pengaruh lama penyimpanan dan pemberian GA3 terhadap perkecambahan cacao (*Theobroma cacao* L.) dan perubahan kadar protein kotiledonnya.....31
- Suwirmen. - Uji bioassay permeabilitas membrane biji kakao (*Theobroma cacao* L.) setelah pemberian kalsium dan penyimpanan.....39
- Syamsuardi. - Keanekaragaman *Ranunculus* di Indonesia.....45
- Maideliza, T. - Genetic differentiation in *Ranunculus silerifolius* Lévl. (Ranunculaceae) I: Case study of continuous populations.....51
- Nurainas & R. Tamin. - Keanekaragaman Gesneriaceae pada beberapa daerah batu kapur Sumatera Barat.....61

Pengaruh Beberapa Logam Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari *Bacillus brevis* MB 6 pada Medium Fermentasi Limbah Cair Tahu

The Effect of Some Metals on Activity of Enzyme Protease of *Bacillus brevis* MB 6 in Tofu Liquid Waste Media

FESKAHARNY ALAMSYAH, ANTHONI AGUSTIEN dan RURI FAMELIA

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

Abstract

Research about the influence of some metals on enzyme activity of proteases produced by *Bacillus brevis* MB 6 at soybean liquid waste as fermentation medium have been done at Microbiology laboratory. This research use a Completely Randomized Design in factorial, which is a kind of metal (Co^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} and Zn^{+2}) first factor, and the second factor is a concentration metal (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mmol). The result of this research indicated that *B. brevis* MB 6 produced metalloprotease. Metal addition of Co^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} and Zn^{+2} could improve the protease activity from 8 to 153.8 times. The best concentration of metal was found on the 3 mmol concentration of Ca^{+2} is 0.923 Unit/ml.

Key words: *Bacillus brevis*, fermentation, metal, protease

Pendahuluan

Enzim protease merupakan salah satu enzim yang sangat penting dan besar peranannya dalam berbagai industri, seperti: untuk penjemihan dalam industri bir, pengolahan daging (pengempukan), dan sebagai komponen senyawa pembersih dalam industri detergen (Winarno, 1995). Berdasarkan sifat-sifat kimia dan sisi aktifnya, Priest (1992) mengelompokkan enzim protease menjadi empat golongan, yaitu: protease serin, metalloprotease, protease sistein dan protease asam. Keaktifan enzim metalloprotease bergantung pada adanya metal yang biasanya terdapat hubungan stoikiometrik, yaitu satu mol metal permol enzim. Enzim tersebut dibambat oleh Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) yang dapat mengkelat

metal sehingga keaktifan enzim hilang.

Enzim dapat dihasilkan oleh hewan, tumbuhan dan mikroba. Enzim yang berasal dari mikroba umumnya paling baik untuk pemanfaatan komersial karena dapat dihasilkan dalam jumlah yang lebih banyak. Selain itu mikroba tumbuh cepat dan biaya produksi lebih rendah (Marx, 1991). Mikroba penghasil protease yang potensial adalah *Bacillus*, *Proteus*, *Serratia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus oligosporus*, *Actinomucor elegans* dan *Alternaria tenuissima* (Wandersman, 1989). Protease dari *Bacillus* bermanfaat dalam industri roti (memperbaiki tekstur adonan, mengurangi waktu pencampuran dan meningkatkan volume), industri keju (menggumpalkan susu), industri kulit (membersihkan bulu), di bidang kesehatan (membantu pencernaan dan pengobatan luka

bakar) dan industri pasta gigi (Moon dan Pa-rulekar, 1991).

Bakteri *B. brevis* MB 6 merupakan salah satu mutan dari *B. brevis* menggunakan Natrium Azida (NaN_3) dengan konsentrasi 0,10 mM yang produksi dan aktivitas proteasenya lebih tinggi dari galur induk (Mairita, 2003). Menurut Pero dan Sloma (1993), *B. brevis* dapat menghasilkan protease dari golongan metalloprotease.

Mikroba dalam memproduksi enzim membutuhkan bahan-bahan tertentu yang terkandung pada media seperti senyawa karbon, nitrogen, asam amino esensial, garam-garam sumber nitrogen, fosfat, sulfat serta Ca, Zn, Mo, Cu dan Fe. Menurut Priest (1992), Mn, Fe dan Zn sangat diperlukan dalam metabolisme sekunder, produksi protease dipengaruhi oleh Mn. Logam Ca pada media dapat menstimulasi produksi enzim protease dari *B. subtilis* dan *B. brevis*. Agustien (1991) melaporkan bahwa konsentrasi logam Co yang paling baik sebagai ko-faktor untuk meningkatkan aktivitas protease dari *B. brevis* adalah 2,0 mmol.

Limbah cair tahu masih mengandung protein terlarut dan terdispersi dalam air yang tidak tergumpalkan pada proses pembuatan tahu, serta mineral yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba, sehingga dapat digunakan sebagai medium fermentasi untuk memproduksi enzim protease dari mikroba. Pemanfaatan limbah cair tahu sebagai media fermentasi merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi pencemaran lingkungan yang disebabkan oleh limbah tersebut, dengan mengubahnya menjadi produk yang berguna bagi kehidupan manusia. Oleh sebab itu dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui jenis protease yang dihasilkan oleh *B. brevis* MB 6 dan

menentukan aktivitas enzim protease yang terbaik dari mutan MB 6 dengan pemberian beberapa jenis logam pada beberapa konsentrasi.

Bahan dan Metode

Bahan yang dibutuhkan adalah biakan murni *B. brevis* MB 6, media Nutrien Agar, Skim Agar, limbah cair tahu, tepung tapioka, EDTA 1 mM pH 7,0, buffer borax 0,01 M pH 8,0, kasein, HCl, CoCl_2 , MnSO_4 , CaCl_2 , ZnSO_4 , larutan tirosin, TCA, Na_2CO_3 , reagen folin ciocalteu, alkohol, spritus, kapas dan akuades.

Setelah didapatkan enzim protease dari *B. brevis* MB 6 maka dilakukan analisis pengaruh beberapa logam terhadap aktivitas protease tersebut dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam Faktorial dengan tiga ulangan.

Adapun perlakuannya terdiri atas dua factor yaitu: 1. faktor A (Jenis logam: $\text{A1}=\text{Co}^{+2}(\text{CoCl}_2)$; $\text{A2}=\text{Mn}^{+2}(\text{MnSO}_4)$; $\text{A3}=\text{Ca}^{+2}(\text{CaCl}_2)$, dan $\text{A4}=\text{Zn}^{+2}(\text{ZnSO}_4)$), 2. faktor B (Konsentrasi larutan logam: $\text{B1}=1,0$ mmol; $\text{B2}=1,5$ mmol; $\text{B3}=2,0$ mmol; $\text{B4}=2,5$ mmol; $\text{B5}=3,0$ mmol. Sebagai standar perlakuan ini dibandingkan dengan aktivitas protease yang dihasilkan oleh *B. Brevis* MB 6 tanpa penambahan logam tapi ditambahkan EDTA.

Uji Metalloproteolitik Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah mutan dari *Bacillus brevis* (MB 6). Kemampuan menghasilkan enzim metalloprotease diuji dengan menginokulasikan bakteri ini pada medium skim agar yang mengandung 1 mM EDTA pH 7,0. Setelah 48 jam inkubasi jika terdapat zona bening di sekitar koloni berindikasi enzim metalloprotease telah dihasilkan.

Pembuatan Inokulum

1-2 ose biakan murni *B. brevis* MB 6 dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 ml medium fermentasi, lalu diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 180 rpm pada suhu kamar selama 17 jam (OD mencapai 0,6).

Produksi Enzim Protease

Limbah cair tahu disaring dengan kertas saring Whatmann No. 42, kemudian disterilkan dengan menggunakan autoclave, lalu ditambahkan tepung tapioka yang sudah steril. Medium ini digunakan sebagai medium fermentasi. Sebanyak 10 ml inokulum dimasukkan ke dalam 90 ml media fermentasi tersebut, kemudian diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 180 rpm, pada suhu kamar selama 24 jam. Selanjutnya diisolasi enzim dengan cara media produksi disentrifus pada kecepatan 4500 rpm selama 15 menit, kemudian dicatat volume supernatan yang merupakan larutan crude enzim ekstraseluler dan dilakukan analisa pengaruh logam Co, Mn, Ca, dan Zn terhadap aktivitas protease dari *B. brevis* Mb 6 menurut metoda Bergmeyer.

Analisis Pengaruh Logam Co, Mn, Ca, dan Zn terhadap aktivitas Protease

Masing-masing tabung reaksi dimasukkan 1 ml substrat kasein dan ditambahkan 1 ml buffer borax 0,01 M pH 8,0, 0,20 ml HCL 0,05 M dan 0,20 ml larutan enzim, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 2 ml larutan TCA, kemudian ditambahkan 0,20 ml larutan logam dengan konsentrasi sesuai perlakuan, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit, disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Filtrat yang diperoleh diambil 1,50 ml dan ditambahkan 5 ml Na₂CO₃ 0,4 M serta 1 ml

reagen folin, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 580 nm. Untuk blanko, 0,20 ml akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml buffer borax 0,01 M pH 8,0, 1 ml kasein dan 0,20 ml HCL 0,05 M, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan enzim sebanyak 0,20 ml dan 2 ml TCA 0,1 M, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Sedangkan untuk standar, 1 ml buffer borax 0,01 M pH 8,0 dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml kasein, 0,20 ml HCL 0,05 M dan tirosin standar 5 µM, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian dimasukkan 0,20 ml larutan enzim dan 2 ml larutan TCA 0,1 M dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit, lalu disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan hal yang sama seperti terhadap enzim contoh.

Aktivitas protease ditentukan dengan menggunakan rumus berikut (Pero dan Sloma, 1993):

Aktivitas protease (unit/ml)=

$$\frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times P \times 1/T$$

A_{sp} = absorbansi sampel; A_{bl} = absorbansi blanko; A_{st} = absorbansi standar P = faktor pengenceran; T = waktu interaksi.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan aktivitas enzim dianalisa secara statistik dan bila terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji DNMRT pada taraf 5%.

Hasil dan Pembahasan

Uji Metalloproteolitik

Uji metalloproteolitik terhadap *B. brevis* MB 6, menunjukkan bahwa zona bening pada perlakuan tanpa penambahan EDTA sekitar 2,0 cm dan menurun menjadi 0,9 cm pada perlakuan dengan penambahan EDTA. Ternyata EDTA yang terkandung dalam medium dapat menurunkan aktivitas enzim protease. Hal ini disebabkan enzim protease yang disekresikan oleh *B. brevis* ke medium, aktivitas enzimnya dalam menghidrolisis kasein dihambat oleh EDTA.

Metalloprotease merupakan protease yang aktivitasnya tergantung adanya logam. Logam yang dapat mengaktifkan kelompok enzim ini adalah Mg, Zn, Co, Fe, Hg, Cd, Ni, dan Ca. Namun enzim ini terhambat karena adanya EDTA yang mengkelat logam sehingga aktivitas enzim berkurang, juga dihambat oleh Sianida dan Pb (Fardiaz, 1988). Senyawa penghambat enzim ini digunakan untuk mendapatkan atau melacak sisi aktif enzim. Senyawa penghambat enzim tersebut dipilih sebagai senyawa yang akan berikatan dengan sisi aktif sedemikian sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substratnya (Ristiarini, 1997). Menurut Pero dan Sloma (1993) metalloprotease biasanya dihasilkan oleh *Bacillus*, dimana enzim ini membutuhkan kation logam divalent.

Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim protease

Aktivitas protease tertinggi diperoleh pada perlakuan penambahan logam Ca dengan konsentrasi 3,0 mmol, yaitu 0,923 Unit/ml yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (Tabel 1). Sedangkan penambahan logam Ca dengan konsentrasi 2,5 mmol aktivitas proteasenya berbeda tidak nyata dengan penambahan Ca pada

konsentrasi 2,0 mmol, tetapi berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan pada penambahan CaCl_2 konsentrasi 3,0 mmol menyebabkan lebih banyak ion Ca yang membentuk ikatan koordinasi dengan rantai spesifik pada tempat aktif dan pada saat yang sama membentuk satu atau lebih ikatan koordinasi pula dengan substrat. Adanya ikatan tersebut membantu polarisasi di dalam substrat, sehingga dapat dipecah oleh enzim (Martin, Mayes dan Rodwell, 1983). Pada penelitian ini, ternyata semakin tinggi konsentrasi CaCl_2 yang diberikan semakin tinggi pula aktivitas protease yang dihasilkan. Disamping itu kalsium merupakan logam yang spesifik untuk enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus brevis* MB 6. Kalsium merupakan kofaktor yang dapat memberikan kestabilan yang tinggi terhadap enzim protease, sehingga aktivitas protease pun menjadi tinggi. Menurut Mc Conn, Tsuru, dan Yasunobu (1964), ion kalsium dapat mencegah autolisis pada protease. Ion kalsium hendaknya diberikan pada enzim dengan tujuan untuk meminimalisasi autolisis. Dengan kata lain kalsium diperlukan untuk meningkatkan aktivitas dengan cara menjaga stabilitas dari enzim protease.

Adanya perbedaan aktivitas protease dengan penambahan beberapa logam pada enzim protease diduga disebabkan oleh perbedaan keelektronegatifan dari masing-masing logam sehingga mempengaruhi ikatan elektrostatik antara ion dengan gugus karboksil di dalam molekul hidrofobik. Menurut Wandersman (1989), logam dapat menstabilkan enzim. Protease yang berasal dari bakteri dapat distabilkan dengan ion Ca melalui ikatan elektrostatik antara Ca^{+2} dengan gugus karboksil di dalam molekul hidrofobik bagian dalam.

Tabel 1. Rata-rata aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *B. brevis* MB 6 oleh penambahan beberapa logam pada beberapa konsentrasi

No.	Perlakuan	Aktivitas protease (Unit/ml)*
1.	Ca (3,0 mmol)	0,923 a
2.	Ca (2,5 mmol)	0,604 b
3.	Ca (2,0 mmol)	0,554 b
4.	Zn (2,0 mmol)	0,249 c
5.	Mn (3,0 mmol)	0,240 c
6.	Ca (1,5 mmol)	0,237 c
7.	Mn (2,5 mmol)	0,235 c
8.	Mn (2,0 mmol)	0,229 c
9.	Zn (1,5 mmol)	0,203 c
10.	Mn (1,5 mmol)	0,171 c
11.	Zn (2,5 mmol)	0,144 c
12.	Zn (1,0 mmol)	0,115 c
13.	Ca (1,0 mmol)	0,104 c
14.	Co (3,0 mmol)	0,103 c
15.	Mn (1,0 mmol)	0,084 c
16.	Co (2,5 mmol)	0,082 c
17.	Co (2,0 mmol)	0,070 c
18.	Zn (3,0 mmol)	0,051 c
19.	Co (1,5 mmol)	0,049 c
20.	Co (1,0 mmol)	0,048 c

* Angka-angka pada setiap lajur yang tidak diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda nyata pada Uji DNMRT taraf 5 %

Banyak enzim terdiri dari protein yang bergabung dengan molekul organik dengan berat molekul rendah yang dinamakan koenzim. Bagian proteinnya disebut apoenzim. Bila bergabung kedua bagian tersebut membentuk enzim yang lengkap disebut holoenzim. Dalam beberapa hal, bagian non protein suatu enzim dapat berupa logam, misalnya besi pada enzim katalase. Jadi banyak enzim membutuhkan penambahan ion-ion logam (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} dan sebagainya) untuk menjadi teraktivasi. Ion-ion ini dianggap sebagai koenzim anorganik atau kofaktor. Kadang-kadang dibutuhkan ke-

dua-duanya, yaitu baik koenzim (organik) maupun kofaktor untuk membuat suatu enzim menjadi aktif. Dengan adanya kofaktor ion logam tersebut maka enzim protease metal yang inaktif menjadi teraktivasi atau membentuk enzim kompleks (holoenzim) yang aktif (Pelczar dan Chan, 1986).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Bacillus brevis* MB 6 dapat menghasilkan enzim protease dari golongan metalloprotease. Aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus brevis* MB 6 meningkat dengan penambahan logam Co, Mn, Ca dan Zn pada konsentrasi 1,0-3,0 mmol, aktivitas protease terbaik dihasilkan pada penambahan Ca konsentrasi 3,0 mmol sebesar 0,923 Unit/ml.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Prof. Drs. Jasmi Jusfah, MS. atas fasilitas yang diberikan di laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Unand, Padang.

Daftar Pustaka

- Agustien, A. 1991. *Pengaruh beberapa logam terhadap aktivitas dan pemurnian protease dari Bacillus subtilis*. Laporan KPK IPN 642 dan Penelitian-an Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor.
- Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. PAU Pangan dan Gizi. Bogor.
- Mairita, R. 2003. *Produksi protease dari mutan Bacillus brevis yang diinduksi dengan Natrium azida*. Skripsi Sarjana Biologi FMIPA Unand. Padang.
- Martin, D.W., P. A. Mayes and V. W. Rodwell. 1983. *Biokimia* (Harper's review of Bio-

- chemistry). EGC. Penerbit Buku Kedok-teran. Jakarta.
- Marx, J. L. 1991. *Revolusi Bioteknologi*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Moon, S. H and S. J. Parulekar. 1991. *A Parametric Study of Protease Production in Batch and Fed-batch Cultures of Bacillus firmus*. John Wiley and Sons. Inc. Chicago.
- Pelczar, M. J and E. C. S. Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Pero, J and A. Sloma. 1993. *Proteases*. Omni Gene Inc. Cambridge.
- Priest, F. G. 1992. *Enzymes Extracellular*. In Encyclopedia of Microbiology. Ed. Joshua Liderberg Vol. 2. Academic Press Limited. Inc. New York.
- Ristiarini, S. 1997. *Deteksi dini bakteri peng-hasil enzim protease serin*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Widy Mandala. Surabaya.
- Wandersman, C. 1989. *Microreview-secretion, Processing and Activation of Bacterial Extra-cellular Proteases*. Unite de Genetique Mole-culaire. Institute Pasteur. Paris.
- Winarno, F. G. 1995. *Enzim Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Diterima: 30 Feb. 2005, disetujui 2 Juni 2005