

Studi Pengaruh Penambahan Mineral terhadap Aktivitas Protease dari *Bacillus circulans* 9b3

Sri Widowati, Lalu Sukarno, dan P. Raharto

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Kelemahan enzim semi kasar ialah stabilitas dan aktivitasnya rendah. Salah satu cara yang dilakukan untuk meningkatkan stabilitas dan aktivitas enzim, yaitu pemberian aditif berupa mineral atau ion logam. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease bervariasi tergantung jenis logam dan konsentrasi. Tujuan penelitian adalah mempelajari pengaruh beberapa jenis mineral terhadap aktivitas protease dari *Bacillus circulans* 9b3. Jenis mineral divalen yang ditambahkan, yaitu MgSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CaCl_2 , dan FeSO_4 dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mM. Pengaruh penambahan mineral terhadap aktivitas protease dihitung dalam persen, dibandingkan dengan aktivitas protease kontrol (tanpa mineral) yang dianggap 100%. Hasil penelitian menunjukkan pada semua tingkat konsentrasi, ion logam Mn^{2+} dan Ca^{2+} dapat meningkatkan aktivitas protease. Kenaikan aktivitas tertinggi dicapai pada konsentrasi 1,5 mM, berturut-turut untuk penambahan Ca^{2+} dan Mn^{2+} , yaitu 5 dan 31%. Pada semua tingkat konsentrasi, ion Mg^{2+} menurunkan aktivitas protease, sedangkan ion logam lain pengaruhnya tidak menentu. *B. circulans* 9b3 yang dipakai untuk produksi dua buah plasmid.

Kata kunci: Protease, *Bacillus circulans* 9b3, mineral, aktivitas enzim

ABSTRACT

One powerlessness of the enzyme storage is low stabilities and activities. Several methods are usually used to enhance stabilization and activity such as minerals or metal ion addition. Other method to increase production and enzyme activity is molecular technique. Effect mineral addition toward enzyme activity is various depending on the kind and mineral concentration. The aims of this research are to study the minerals effect to protease activity, and to isolate of chromosome and plasmid from *Bacillus circulans* 9b3. Some divalen minerals added are MgSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CaCl_2 , and FeSO_4 in several concentrations i.e. 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 mM. Effect of mineral addition to protease activity is calculated as percent to protease control (100%). Pitcher method was used for chromosome isolation, whereas alkaline lysis was used for plasmid isolation. Results showed that Mn and Ca ions have increase of protease activity in all concentration level. The highest activity was reached at 1.5 mM of mineral Ca and Mn addition, i.e. 5 and 31%, respectively. At all concentration level, Mg have decreased the enzyme activity, while other ions addition have uncertained effect. *B. circulans* 9b3 bacteria has approximately 23 kb chromosomal DNA, and contain two plasmids. This research will be continued to digest the genomic DNA with restriction enzymes.

Key words: Protease, *Bacillus circulans* 9b3, mineral, enzyme activity

PENDAHULUAN

Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Karena itu, enzim ini termasuk dalam kelas utama enzim golongan hidrolase (Winarno, 1983). Protease ialah enzim yang sangat kompleks, mempunyai sifat fisiko kimia dan sifat katalitik yang sangat bervariasi. Protease dapat dihasilkan secara ekstraseluler dan intraseluler dan mempunyai peranan penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward, 1983).

Protease dari *Bacillus circulans* 9b3 mempunyai kemampuan sebagai antilipase dan dapat dimanfaatkan dalam pengawetan bekatul (Widowati *et al.*, 2000). Protease kasar setelah mengalami tahap dialisis mempunyai aktivitas sekitar 30-34 U/ml.

Aktivitas enzim berhubungan langsung dengan perubahan struktur tersier dari molekul protein enzim. Keadaan suhu, pH, dan konsentrasi ion normal, struktur tersier distabilkan oleh empat jenis reaksi, yaitu ikatan hidrogen, gaya tarik ionik, interaksi hidrofobik, dan jembatan kovalen. Berbagai cara dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas dan aktivitas enzim, salah satunya adalah penambahan aditif berupa ion logam. Daya stabilitas ion logam terhadap protease tergantung dari logam yang bersangkutan dan konsentrasinya. Logam NaCl (2 mM), CoCl₂ (6 mM), dan PbCl₂ (2 mM) yang diteliti dapat meningkatkan aktivitas protease *B. pumilus* YI sebesar 117, 131, dan 96,6% (Satiawihardja *et al.*, 1997).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai mineral terhadap aktivitas protease dari *B. circulans* 9b3 dan stabilitas enzimnya.

BAHAN DAN METODE

Produksi Protease Skala Lima Liter

Lima tabung biakan *B. circulans* 9b3 yang ditumbuhkan dalam medium nutrisi agar (NA) miring diinokulasikan ke dalam medium propagasi, dan digoyang dengan kecepatan 150 rpm selama 16 jam pada suhu 28°C (Azizah *et al.*, 1999). Medium propagasi yang digunakan sama dengan medium fermentasi, yaitu air rendaman kedelai pH 10, dengan volume 1/10 dari medium fermentasi. Setelah itu, diteruskan dengan tahap fermentasi protease pada skala lima liter dengan kondisi pH tidak terkontrol, suhu 28°C, dengan kecepatan agitasi 230 rpm, dan waktu inkubasi 20 jam. Hasil fermentasi disentrifugasi pada 4.000 rpm, suhu 4°C, selama 30 menit. Supernatan diendapkan dalam aseton selama semalam dengan perbandingan enzim kasar dengan aseton 2 : 3 di ruang dingin. Kemudian disentrifugasi pada 6.000 rpm, suhu 4°C, selama 30 menit, dan enzim yang diperoleh dilarutkan dalam bufer fosfat 0,02 M pH 8.

Penambahan Mineral

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas dan inhibisi protease diuji dengan cara menambahkan berbagai larutan yang berbeda, yaitu $MgSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, dan $ZnSO_4$ masing-masing dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mM selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dalam bufer Tris (Edlin *et al.*, 1988). Setelah itu, dilakukan pengukuran aktivitas protease dengan metode modifikasi dari Bergmeyer dan Grassl (1983), sedangkan kadar protein dengan metode modifikasi dari Bradford (1976).

Analisis Aktivitas Protease

Sebanyak 0,2 ml protease ditambahkan pada campuran yang berisi 1 ml bufer borat pH 8, 1 ml bufer kasein, dan 0,2 ml HCl 0,05 M dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 35 menit. Setelah itu ditambah 0,2 ml $CaCl_2$ 2 mM, diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian diambil 1,5 ml supernatan dan ditambah dengan 5 ml larutan Na_2CO_3 0,4 M dan 1 ml pereaksi Folin, diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm (Bergmeyer dan Grassl, 1983, modifikasi).

Isolasi Genom *B. circulans* 9b3

Isolasi Kromosom

DNA kromosom diekstraksi dengan metode Pitcher (Pitcher *et al.*, 1989). Endapan sel dari 1,5 ml kultur cair diresuspensikan ke dalam 100 μ l bufer TE yang mengandung lysozime 50 mg/ml, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Campuran tersebut ditambah 500 μ l bufer GES dan dicampur dengan cara membalik-balikkan tube sampai sel lisis, kemudian divortex selama 5 detik dan diinkubasikan dalam es selama 5 menit. Sebanyak 250 μ l amonium asetat 7,5 M ditambahkan dan larutan diinkubasi dalam es selama 10 menit, diikuti dengan penambahan 500 μ l larutan kloroform/isoamilalkohol 24 : 1 (v/v) dan dicampurkan dengan membalik-balikkan tube secara cepat, lalu disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 detik. Lapisan teratas diambil secara hati-hati dan ditambahkan isopropanol (1v/1v), dan disentrifus pada 8.000 rpm selama 30 detik. Supernatan dibuang, kemudian pellet dicuci dengan 70% etanol, dan diresuspensikan dalam 100 μ l bufer TE. DNA kromosom kemudian dicek dengan gel agarose 0,7%.

Isolasi Plasmid

Isolasi plasmid endogenous dilakukan dengan metode alkalin lisis (Birnboim dan Doly, 1979). *B. circulans* 9b3 ditumbuhkan 24 jam pada media LB broth, kemudian ditempatkan pada 1,5 ml mikrotube dan diendapkan

dengan sentrifugasi (12.000 g selama 5 menit). Pelet kemudian diresuspensikan ke dalam larutan I (25% sukrose dalam bufer TE mengandung 10 mg/ml lysozime) dalam sebuah mik-rotube steril, dan diinkubasikan pada temperatur ruang selama 35 menit. Sebanyak 200 µl larutan II ditambahkan dan dicampurkan dengan membalikkan tube secara hati-hati sampai sel lisis. DNA kromosom dan protein kemudian dihilangkan dengan penambahan larutan III dingin kemudian dikocok. Campuran ini kemudian disentrifus selama 5 menit (12.000 g), dan supernatan dipindahkan ke tabung yang lain. Supernatan kemudian ditambah 400 µl fenol kloroform. Campuran divortex, lalu disentrifugasi selama 5 menit. Lapisan atas dari campuran ini diambil, dipindahkan ke tube yang baru dan ditambah 400 µl 100% etanol dingin, dikocok, dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 menit, kemudian disentrifugasi selama 5 menit. Alkohol kemudian dibuang dengan menggunakan pipet tip. Pelet kemudian diresuspensikan dalam 39 µl air distilata steril dan ditambahkan 1 µl dari 1 mg/ml stok ribonuclease, dicampur secara perlahan dilanjutkan dengan sentrifugasi (12.000 g selama 5 menit). Plasmid kemudian *dirun* pada gel agarose 0,7%.

Elektroforesis

Elektroforesis untuk mengecek adanya DNA (plasmid, kromosom, hasil pe-motongan) dilakukan dengan menggunakan 0,7% gel elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dalam bufer 1XTAE (40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM sodium asetat dan 2 mM EDTA). Sebelum *loading*, sampel DNA dan DNA marker dicampur dengan 10x *loading dye*. Elektroforesis dilakukan pada 60 V pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian dilanjutkan proses *staining* dalam 1 mg/ml etidium bromida selama 30 menit, dan didestain dalam air distil selama 10 menit. DNA divisualisasikan dengan UV trasluminator dan difoto dengan Polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Penambahan Mineral terhadap Aktivitas Protease

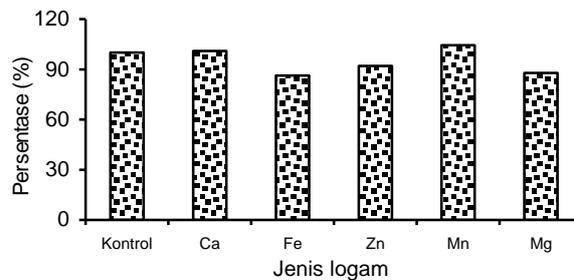
Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ion logam dapat meningkatkan aktivitas enzim. Ward (1983) menyatakan bahwa ion Ca^{2+} dapat menstabilkan enzim proteinase logam netral asal *Bacillus* dari denaturasi. Enzim yang distabilkan oleh ion Ca^{2+} , termasuk protease termosilin yang dihasilkan oleh *B. stearo-thermophilus*. Termosilin ini mempunyai struktur yang dibentuk oleh ikatan elektrostatis kuat antara ion Ca^{2+} dengan gugus karboksilat pada residu aspartat dan glutamat atau gugus karbonil, sehingga konformasi protein lebih stabil (Weisman, 1978).

Ion logam sebagai aditif umumnya ditambahkan dalam bentuk garam, misalnya ion Ca^{2+} dalam bentuk garam klorida (Schwimmer, 1981). Kation-kation lain yang telah diketahui untuk mengaktifkan enzim adalah Na^+ , K^+ ,

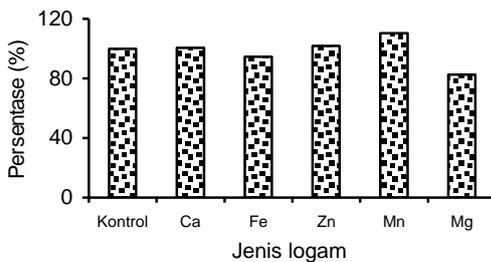
Rb⁺, Cs⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, dan Al³⁺. Ion-ion dapat mengaktifkan enzim disebabkan oleh beberapa perubahan mekanis antara lain (1) adanya bagian yang utuh pada sisi aktif, (2) bentuk ikatan rantai antara enzim dan substrat, (3) perubahan konstanta keseimbangan pada reaksi, (4) perubahan muatan permukaan pada protein enzim, (5) menghilangkan hambatan pada reaksi, (6) mengganti ion-ion logam yang tidak efektif dari sisi aktif atau substrat, dan (7) mengganti keseimbangan konformasi dari kurang aktif menjadi lebih aktif (Richardson dan Hyslop, 1985). Pada penelitian ini ion logam yang ditambahkan berbentuk mineral, yaitu Mg²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, dan Fe²⁺. Pengaruh ion logam dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3, 4, dan 5.

Gambar 1 menunjukkan bahwa penambahan logam dengan konsentrasi 0,5 mM berpengaruh sangat kecil terhadap peningkatan aktivitas enzim, yaitu 1,03 (Ca²⁺) dan 4,40% (Mn²⁺), bahkan ion Fe²⁺, Zn²⁺, dan Mg²⁺ menurunkan aktivitas secara nyata, yaitu berturut-turut 13,63; 8,03; dan 12,11%.

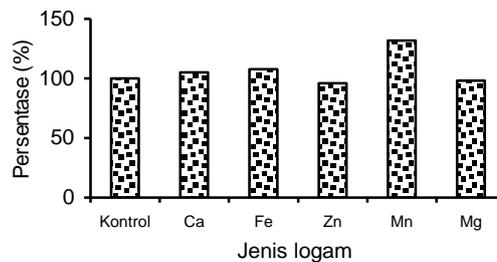
Pada Gambar 2, ion Ca²⁺, Mn²⁺, dan Zn²⁺ juga dapat meningkatkan aktivitas protease berturut-turut menjadi 100,58; 110,28; dan 101,83%. Namun pengaruh Zn²⁺ tidak beraturan. Konsentrasi 1,5% (Zn²⁺) kembali menurunkan aktivitas protease menjadi 95,93% (Gambar 3). Ion Fe²⁺ dapat meningkatkan aktivitas protease menjadi 107,8%, sedangkan Mn²⁺ meningkat aktivitasnya



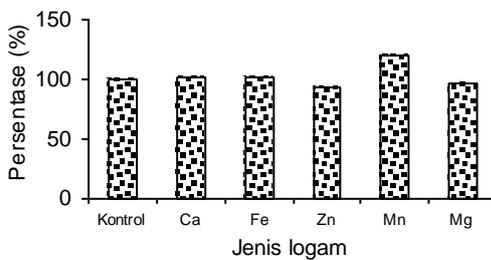
Gambar 1. Pengaruh penambahan logam 0,5 mM terhadap aktivitas protease dari *B. circulans* 9b3



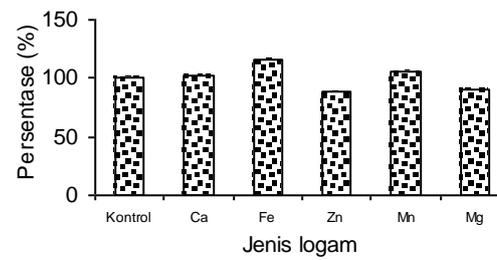
Gambar 2. Pengaruh penambahan logam 1,0 mM terhadap aktivitas protease dari *B. circulans* 9b3



Gambar 3. Pengaruh penambahan logam 1,5 mM terhadap aktivitas protease dari *B. circulans* 9b3



Gambar 4. Pengaruh penambahan logam 2,0 mM terhadap aktivitas protease dari *B. circulans* 9b3



Gambar 5. Pengaruh penambahan logam 2,5 mM terhadap aktivitas protease dari *B. circulans* 9b3

menjadi 131,79%.

Gambar 4 dan 5 menunjukkan bahwa penambahan logam sebesar 2,0 dan 2,5 mM memberikan hasil serupa, yaitu ion Ca^{2+} , Fe^{2+} , dan Mn^{2+} dapat meningkatkan aktivitas protease sedangkan Zn^{2+} dan Mg^{2+} berpengaruh negatif. Dari keseluruhan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa Ca^{2+} dan Mn^{2+} selalu meningkatkan aktivitas protease *B. circulans* 9b3, sebaliknya Mg^{2+} berpengaruh menurunkan. Logam Fe^{2+} dan Zn^{2+} pengaruhnya tidak menentu. Hal serupa juga terjadi pada fitase. Lolas dan Markakis (1977) menyatakan bahwa Mg^{2+} dan Mn^{2+} memberikan efek positif pada fitase dari *Phaseolus vulgaris*, namun bagi fitase *Enterobacter* sp. 4 memberikan efek negatif (Yoon *et al.*, 1996)

Isolasi Genom Bakteri Lokal *B. circulans* 9b3.

Isolasi DNA Kromosom

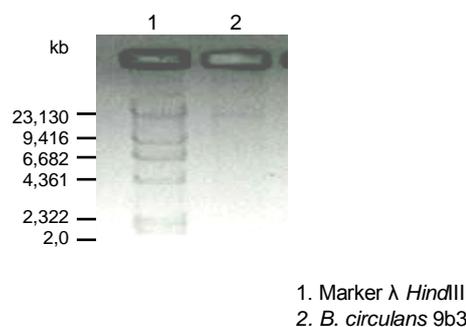
Teknik yang digunakan untuk memecah dan membuka isi sel dalam penelitian ini ialah lisis kimiawi. Untuk mendapatkan DNA kromosom murni, dilakukan pemurnian dengan etanol. Keuntungan pemurnian dengan etanol ialah tertinggalnya komponen asam nukleat monomer dan rantai pendek dalam larutan (Sumitro *et al.*, 1996).

Hasil isolasi dianalisis dengan elektroforesis gel dan dapat dilihat pada Gambar 6. Dari gambar tersebut, DNA kromosom isolat *B. circulans* 9b3 mempunyai ukuran basa sekitar 23 kb yang terdiri dari satu pita. Ukuran yang sama juga dilaporkan oleh Hakamada *et al.* (1994) pada beberapa strain *Bacillus* sp. penghasil protease.

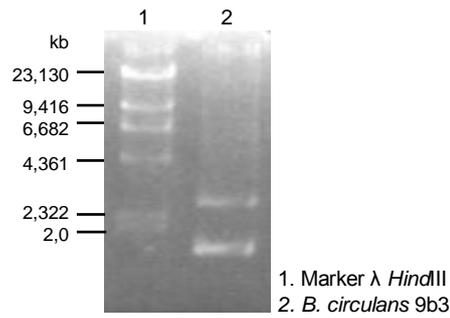
Isolasi DNA Plasmid

Selain DNA kromosom, DNA plasmid dari suatu bakteri perlu dilakukan isolasi untuk membentuk pustaka genomnya. Isolasi plasmid dilakukan dengan metode Birnboim dan Doly (1979).

Hasil isolasi plasmid isolat tersebut menghasilkan dua pita (Gambar 7).



Gambar 6. Hasil isolasi kromosom isolat *B. circulans* 9b3



Gambar 7. Hasil isolasi plasmid isolat *B. circulans* 9b3

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian DNA kromosom serta plasmid isolat *B. circulans* 9b3

Parameter	<i>B. circulans</i> 9b3	
	DNA kromosom	DNA plasmid
Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2,28	4,10
Kemurnian	1,5	1,4

Hal ini menunjukkan bahwa plasmid berhasil diisolasi. Dengan menggunakan spektrofotometer dapat ditentukan konsentrasi dan kemurnian DNA kromosom isolat tersebut. Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dan kemurnian DNA kromosom isolat *B. circulans* 9b3 ialah 2,28 dan 1,5. Sedangkan plasmidnya mempunyai konsentrasi dan kemurnian sebesar 4,10 dan 1,4 (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA kromosom dan plasmid dari isolat tersebut memenuhi syarat sebagai bahan dalam eksperimen kloning untuk tahap selanjutnya.

KESIMPULAN

Penambahan ion Mn^{2+} dan Ca^{2+} pada semua konsentrasi (0,5-2,5 mM) meningkatkan aktivitas protease *B. circulans* 9b3, berarti logam tersebut merupakan aktivator. Penambahan ion logam Mg^{2+} pada semua konsentrasi menurunkan aktivitas protease *B. circulans* 9b3 sedangkan Zn^{2+} dan Fe^{2+} pengaruhnya tidak menentu.

Bakteri *B. circulans* 9b3 yang dipakai untuk memproduksi enzim protease ini mempunyai kromosom yang berukuran sekitar 23 kb dan mengandung dua plasmid. Hasil isolasi kromosom dan plasmid ini akan diteruskan dengan pemotongan dengan enzim restriksi pada penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, N., S. Widowati, Misgiyarta, dan L. Sukarno. 1999.** Produksi protease skala satu liter dan aplikasinya pada bekatul. *Dalam* Widowati, S., D.S. Damardjati, N. Azizah, D. Andriani, L. Sukarno, dan Misgiyarta (Eds.). Bioproses Enzimatis dalam Reduksi Asam Fitat dan Inaktivasi Lipase untuk Perbaikan Mutu Bekatul. Laporan Hasil Penelitian Balitbio Bogor.
- Bergmeyer, H.V. and M.G. Grassl. 1983.** Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim. Vol. II.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Ac. Res.* 7(6):1513-1522.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Edlin, D.N.A., A. Narbad, M.J. Gasson, J.R. Dickinson, and D. Lloyd. 1988.** Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *J. of Enz. and Microbio. Tech.* 22:232-239.
- Hakamada, Y. Kobayashi, J.T. Hitomi, S. Kawai, and S. Ito. 1994.** Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene for an alkaline protease from the alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K16. *J. Fermentation and Bioengineering* 18:105-108.
- Lolas, G.M. and Markakis. 1977.** The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 42:1094-1096.
- Pitcher, D.G., N.A. Saunders, and R.J. Owen. 1989.** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Let. In App. Mic.* 8:151-156.
- Richardson, T. and D.G. Hyslop. 1985.** Enzyme. *In* Fenema, O.R. (Ed.). Food Chemistry. Marcel Dekker Inc., New York.
- Satiawihardja, B.M.T. Suhartono, dan A. Kusnidar. 1997.** Mempelajari pengaruh lingkungan kimiawi terhadap aktivitas dan daya tahan panas protease dari *Bacillus pumilus* Y1. *Buletin Teknologi Industri Pangan* VIII(2):47-56.
- Schwimmer, S. 1981.** Source book of food enzymology. The AVI Publ. Co. Inc., Westport, Connecticut.
- Sumitro, S.B. Rahayu, S. Fatcfiyah, Widyarti, dan S. Arumingtyas. 1996.** Kursus teknik-teknik dasar analisa protein dan DNA. Universitas Brawijaya, Malang.

- Ward, O.P. 1983.** Proteinases. *In* Fogatory, W.M. (*Ed.*). Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publisher. New York.
- Weisman, A. 1978.** Stabilization of enzymes. *In* Wiseman, A. (*Ed.*). Topics in Enzyme and Ferm. Biotechnology Vol. 2. John Willey and Sons. New York.
- Widowati, S., N. Azizah, E.I. Riyanti, L. Sukarno, P. Raharto, dan H. Herawati. 2000.** Bioproses enzimatis dalam reduksi asam fitat dan inaktivasi lipase untuk perbaikan mutu bekatul. Laporan Hasil Penelitian Balitbio Bogor.
- Winarno, F.G. 1983.** Enzim Pangan. PT Gramedia. Jakarta.
- Yoon, S.J., Y.J. Choi, H.K. Min, K.K Cho, J.W. Kim, S.C. Lee, and Y.H. Jung. 1996.** Isolation and identification of phytase-producing bacterium *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 18:449-454.