

Isolasi dan uji aktivitas protease dari aktinobakteri isolat lokal (AKJ-09) Aceh

Isolation and proteolytic activity of local isolates actinobacteria (AKJ-09) from Aceh

Suhartono Suhartono¹, Wiwit Artika²

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Syiah Kuala, Jl. Tgk Syeck Abdurrauf No. 7 Darussalam, Banda Aceh 23111

²Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Syiah Kuala, Jl. Hasan Krueng Kalee, Darussalam, Banda Aceh 23111

Abstract: *Proteases are group of enzymes that hydrolyze proteins. These enzymes are mainly produced by group of microorganisms, including Actinomycetes. The objectives of the research were to isolate and determine proteolytic activity of enzyme recovered from the local strains of actinobacteria (AKJ-09). The research was conducted by culturing and screening the isolates showing proteolytic activity, determining the production curve, measuring protease activity and protein content. Isolate of AKJ-09 was selected for protease isolation and activity determination due to its highest proteolytic activity (Proteolytic Index = 19.93) among other isolates that qualitatively observed during its growth on skim nutrient agar. Isolate of AKJ-09 exhibited protease activity accounting for 0,088 U/ml with specific activity reached 7.56 U/mg on the eighth day of incubation.*

Keywords: *Protease, Actinobacteria, Local isolates, Aceh*

Abstrak: Protease (enzim proteolitik) merupakan enzim yang mampu menguraikan atau memecah molekul protein. Salah satu kelompok mikroorganisme yang mampu menghasilkan protease, yaitu aktinobakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menguji aktivitas enzim proteolitik (protease) dari aktinobakteri isolat lokal (AKJ-09) Aceh. Penelitian ini dilaksanakan dengan melakukan peremajaan isolat, penapisan isolat yang berpotensi sebagai penghasil protease, penentuan kurva produksi protease, dan pengukuran aktivitas protease dan kadar protein. Isolat aktinobakteri AKJ-09 diseleksi untuk diisolasi dan diuji aktivitas proteolitiknya karena menunjukkan aktivitas proteolitik tertinggi dengan Indeks proteolitik (IP = 19,93) di antara kedelapan isolat aktinobakteri lainnya yang secara kualitatif menunjukkan aktivitas proteolitik pada media NAS (Nutrient Agar + Susu Skim). Berdasarkan uji aktivitas proteolitiknya, isolat AKJ-09 menunjukkan aktivitas protease tertinggi pada hari kedelapan sebesar 0,088 U/ml dengan kadar aktivitas spesifik mencapai 7,56 U/mg.

Kata kunci: *Protease, Aktinobakteri, isolat lokal, Aceh*

Pendahuluan

Aktinobakteri (juga dikenal sebagai aktinomiset) merupakan kelompok bakteri Gram positif berbentuk filamen, nonmotil, serta memiliki kandungan G+C tinggi (63-78%), umumnya aerob dan beberapa aerob fakultatif (Ludwig, Euzéby et al. 2012). Aktinobakteri diketahui merupakan kelompok bakteri penghasil senyawa bioaktif terbesar, termasuk enzim protease (Bockle *et al.* 1995; Bressollier *et al.* 1999). Protease (enzim proteolitik) merupakan enzim yang mampu menguraikan atau memecah molekul protein. Enzim ini banyak diaplikasikan dalam industri pangan dan non pangan (Gupta, Beg et al. 2002). Dalam industri pangan, protease digunakan untuk menjernihkan bir, melunakan daging, memperbaiki tekstur adonan roti dan lain-lain (Rao et al. 1998; Suhartono 1992); sedangkan pada industri nonpangan digunakan untuk meningkatkan fungsi detergen dalam membersihkan noda, membantu penyamakan kulit (Crueger & Crueger 1984). Selain itu, kelompok enzim protease, misalnya kolagenase atau subtilisin, digunakan untuk perawatan luka bakar dan protease alkalin yang menggantikan tripsin asal hewan (Rao et al. 1998).

Hasil penelitian terdahulu telah berhasil mengisolasi sejumlah aktinobakteri isolat local (Suhartono & Nursanty, 2012). Hal ini mendorong perlu dilakukannya kajian terhadap isolat-isolat tersebut, termasuk untuk mengetahui kemampuannya menghasilkan enzim proteolitik dan aktivitasnya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi ezim proteolitik (protease) dari aktinobakteri isolat lokal Aceh yang dikoleksi dari kajian sebelumnya. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui tingkat aktivitas proteolitik dari enzim yang telah diisolasi.

Metodologi Penelitian

Alat dan Bahan

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi FKIP Universitas Syiah Kuala. Isolat aktinobakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Syiah Kuala.

Metode Kerja

Isolat aktinobakteri yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilakukan peremajaan. Hal ini dilakukan dengan menginokulasikan isolat aktinobakteri pada cawan yang mengandung media *yeast malt extract* (YM) agar (dalam g/l: *yeast extract* 4, *malt extract* 10, glukosa 4, dan *bacto agar* 15) pH 7.2. Cawan yang telah digores selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama kurang lebih satu minggu dan diamati pertumbuhannya.

Dengan menggunakan *cork borer* yang berdiameter 5 mm, isolat aktinobakteri yang tumbuh pada tahap peremajaan selanjutnya diinokulasikan pada media *nutrient agar* yang ditambahkan susu skim Anlene 1% (NAS) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28 °C untuk dimati indeks proteolitik yang terbentuk. Indeks proteolitik merupakan nisbah antara diameter zona bening yang terbentuk di sekeliling isolat dan diameter isolat.

Metode isolasi dan uji aktivitas mengacu kepada Yuratmoko et al. (2007). Isolat yang memiliki indeks proteolitik terbesar selanjutnya dipindahkan ke dalam Erlenmeyer yang mengandung media *nutrient broth* + susu skim 1 % (NBS) dengan menggunakan *cork borer*. Inokulum selanjutnya diinkubasi pada inkubator bergoyang dengan kecepatan agitasi 240 rpm pada suhu ruang. Setelah hari ketiga, dilakukan pemanenan ekstrak kasar enzim protease yang dilakukan setiap 24 jam hingga hari ke-14 untuk menentukan waktu produksi enzim yang optimum. Pemanenan ekstrak kasar enzim protease dilakukan dengan mengambil supernatant hasil sentrifugasi inokulum pada kecepatan 8.000 g selama 5 menit.

Aktivitas protease diukur dengan menggunakan metode Walter (1984) yang dimodifikasi (Tabel 1). Sebanyak 100 ml ekstrak kasar protease ditambahkan 0,5 ml kasein 1 % (w/v) dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Reaksi antara ekstrak kasar protease dan kasein dihentikan dengan penambahan asam trikloro asetat (TCA) 10 % dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 10 °C. Larutan reaksi selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 8.000 g selama 10 menit untuk kemudian dikoleksi supernatant. Kemudian larutan ditambahkan Na₂CO₃ 0,5 M dan pereaksi Folling Ciocalteau (1:2) sebelum dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah dinkubasi, absorbansi larutan

diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang

membebaskan 1 μmol tirosin per menit pada suhu dan pH optimum.

Tabel 1 Metode pengukuran aktivitas protease (Walter 1984)

Pereaksi	Blanko (μL)	Standar (μL)	Sampel (μL)
Penyangga Tris-HCl (0.05 M) pH 8	500	500	500
Substrat kasein (1%)	500	500	500
Enzim	-	-	100
Akuades steril	100	-	-
Tirosin standar (5 mM)	-	100	-
Diinkubasi pada suhu optimum selama 10 menit			
Asam trikloroasetat (10%)	1000	1000	1000
Akuades steril	-	-	100
Enzim	100	100	-
Diinkubasi pada suhu 10 °C selama 10 menit Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit			
Supernatan	750	750	750
Na ₂ CO ₃	2500	2500	2500
Follin Ciocalteu (1:2)	500	500	500

Didiamkan selama 15 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm

$$\text{Aktivitas protease dihitung dengan rumus : } UA = \frac{A \text{ sampel} - A \text{ blanko}}{A \text{ standar} - A \text{ blanko}} \times P \times t \times \frac{1}{T}$$

Keterangan :

- UA* : jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu mikromol produk tirosin per menit (U/ml)
- A sampel* : nilai absorbansi sampel *P* : faktor pengenceran
- A standar* : nilai absorbansi standar *1/T* : waktu inkubasi (10 menit)
- A blanko* : nilai absorbansi blanko

Tabel 2 Metode pengukuran kadar protein (Bradford 1976)

Jenis Larutan	Perlakuan
Sampel	0.4 ml enzim dicampur dengan 4.0 ml pereaksi Bradford, kemudian dikocok dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm.
Blanko	0.4 ml akuades dicampur dengan 4.0 ml pereaksi Bradford, kemudian dikocok dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm
Standar	0.4 ml BSA (konsentrasi 0.01-0.1 mg/ml) dicampur dengan 4.0 ml pereaksi Bradford, kemudian dikocok dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm.

Komposisi pereaksi Bradford lima kali pekat terdiri atas:

- Coomasie brilliant blue G-250* 22 mg
- Etanol 95% 12.5 ml
- Asam ortofosfat 85% 25 ml
- Akuades 212.5 ml

Sebelum digunakan untuk mengukur kadar protein, pereaksi Bradford diencerkan dengan akuades dengan perbandingan 1:4

Kadar protein diukur dengan mengacu kepada metode mikroessei yang dijelaskan oleh Bradford (1976) (Tabel 2). Sebanyak 0,4 ml sampel enzim direaksikan dengan 4 ml larutan Bradford, dihomogenkan, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit sebelum diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar ditentukan dengan menggunakan bovine serum albumin (BSA) dengan kisaran konsentrasi 0,01 – 0,1 ml/ml protein. Aktivitas spesifik protease (U/mg) merupakan perbandingan antara aktivitas protease (U/ml) dengan kadar protein (mg/ml).

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, terdapat enam isolat aktinobakteri yang diremajakan menunjukkan aktivitas proteolitik pada media NAS (Nutrient Agar + Susu Skim). Delapan isolat tersebut adalah isolat AKJ-09, AKJ-12, ACT-04, ATH-01, ATH-03, ATH-

07, ATH-11 dan ATH-09 dengan indeks pemecahan protein (indeks proteolitik) yang beragam (Tabel 3).

Indeks proteolitik tertinggi ditunjukkan oleh protease dari isolat AKJ-09 yang mencapai 19,93 pasca inkubasi 48 jam. Aktivitas proteolitik yang muncul ditandai dengan adanya zona jernih pada media yang mengindikasikan adanya pemecahan molekul protein yang terkandung di dalam susu skim yang ditambahkan ke dalam media. Nilai indeks proteolitik berbanding lurus dengan kecepatan difusi enzim ekstraseluler protease yang dikeluarkan masing-masing isolat pada media padat NAS (Suhartono, 1992). Penambahan susu skim pada media ditujukan untuk menginduksi aktinomiset untuk mensintesis protease. Isolat AKJ-09 selanjutnya dipilih untuk penentuan kurva produksi serta aktivitas protease dan aktivitas spesifik.

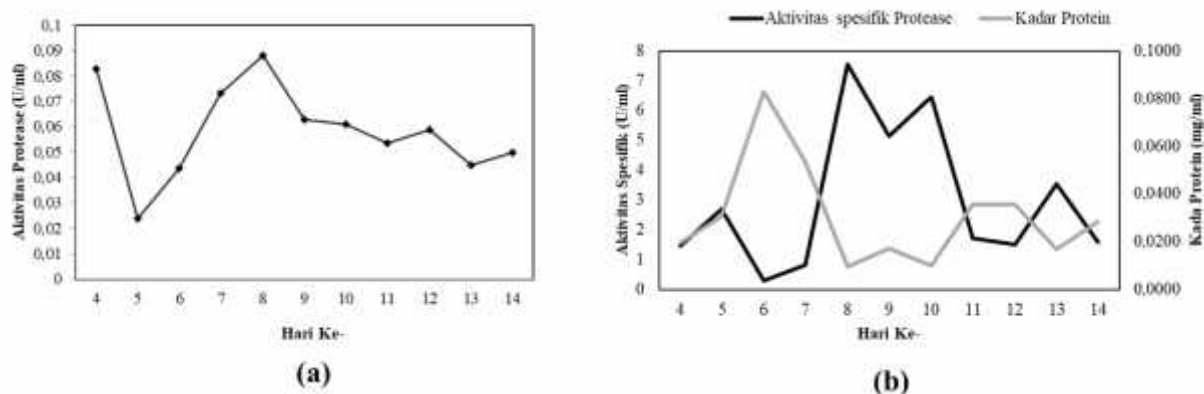
Tabel 3. Indeks proteolitik Aktinomiset isolat lokal

Kode isolat	Indeks Proteolitik (IP) setelah Inkubasi	
	24 Jam	48 Jam
AKJ-09	12,93	19,93
AKJ-12	2,86	3
ATH-01	5,61	6,48
ATH-03	2,9	3,77
ATH-07	11,28	17,53
ATH-09	9,53	14,13

Selama 14 hari, protease isolat AKJ-09 memiliki aktivitas proteolitik yang cukup fluktuatif (Gambar

1a). Aktivitas protease isolat AKJ-09 membentuk tiga puncak, yaitu pada hari ke-4, 8 dan 12. Aktivitas unit protease tertinggi dicapai pada saat inokulum berumur 8 hari, yaitu sebesar 0.088 U/ml. Aktivitas spesifik protease tertinggi yang dicapai pada saat umur biakan 8 hari sebesar 7,56 U/mg dan kadar protein 0.01 mg/ml (Gambar 1b). Munculnya beberapa puncak pada aktivitas enzim dapat diduga adanya isoenzim, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi yang sama, namun memiliki karakteristik fisik dan kimiawi (titik isoelektrik, pH optimum, afinitas substrat, atau adanya enzim inhibitor) yang berbeda karena disintesis oleh gen yang berbeda (Yuratmoko et al., 2007).

Produksi enzim protease isolat AKJ-09 dilakukan pada hari ke-4, ke-5, ke-6, dan ke-7 diperkirakan berada pada fase stasioner. Sintesis protease ekstraseluler biasanya terjadi pada fase diam (stasioner), hal ini terkait dengan mekanisme represi katabolit. Selama fase pertumbuhan eksponensial, sel akan mengalami hambatan represi katabolit, sehingga menurunkan konsentrasi cAMP intraseluler yang dapat mengaktifkan transkripsi mRNA penyandi protease (Suhartono, 1992). Lebih lanjut, Suhartono (1992) menambahkan pada saat memasuki fase stasioner, represi katabolit mulai menurun sehingga mengaktifkan biosintesis enzim. Pola aktivitas protease yang fluktuatif juga dilaporkan dalam penelitian Mubarik & Wirahadikusumah (1996).



Gambar 1. Ekstrak kasar Protease isolat Aktinobakteri AKJ-09 (a) Aktivitas protease setelah ditumbuhkan dalam media NBS pada suhu 28 °C; (b) aktivitas spesifik dan kadar protein protease yang ditumbuhkan dalam media NBS suhu 28 °C.

Kesimpulan

Sebanyak enam isolat aktinobakteri yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan aktivitas proteolitik. Isolat AKJ-09 menunjukkan aktivitas proteolitik tertinggi dengan Indeks proteolitik (IP = 19,93) setelah inkubasi selama 48 jam dan juga aktivitas protease tertinggi pada hari kedelapan sebesar 0,088 U/ml dengan kadar protein 0,01 mg/ml dan aktivitas spesifik mencapai 7,56 U/mg. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengkarakterisasi enzim proteolitik asal isolat aktinobakteri AKJ-09 untuk mengetahui faktor-faktor lingkungan (suhu, pH, keberadaan inhibitor) yang mempengaruhi aktivitas enzim proteolitik yang diperoleh.

Daftar Pustaka

- Bockle, B., Galunsky, B., Muller, R. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology* 61(10): 3705–3710.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein in utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., Verneuil, B. 1999. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6): 2570–2576
- Crueger W, Crueger A. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Madison: Science Tech Inc.
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(1), 15-32.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., & Whitman, W. B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 1-28). Springer New York.
- Mubarik N.R, Wirahadikusumah, M. 1996. Pemurnian dan karakterisasi protease ekstraseluler *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Hayati* 3:50-54.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62:597-635.
- Suhartono, M.T. 1992. *Protease*. Bogor: Depdikbud, DIKTI, PAU IPB.
- Suhartono, S., Nursanty, R. 2012, Bioprospectiong Soil Actinomycetes: Isolation and Antibacterial Assay, *Bioedukasi* 4:1-6, .
- Yuratmoko, D., Mubarik, N.R., Merjandini, A. 2007. Screening of proteolytic enzymes of *Streptomyces* sp. local strains and their characterization. *Microbiology Indonesia* 1(2): 69-73.
- Walter HE. 1984. Proteinase (proteins substrates). Method with haemoglobin, casein and azocoll as substrate. In: Bergmeyer J, Grass M (eds). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Ed. Weinheim Germany: Verlag Chemie. p 270-278.