

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEASE ALKALIN
DARI ISOLAT BAKTERI LIMBAH TERNAK DI EXFARM
FAKULTAS PETERNAKAN UNSOED**

Zusfahair, Puji Lestari, Ari Asnani

Program Studi Kimia, Jurusan MIPA, Fakultas Sains dan Teknik, UNSOED

ABSTRACT

Protease is one of the widely used enzymes for the industry. The potential resource of microorganism that produced protease is milk cow waste. In this research, isolation and characterization has been done toward isolated protease from milk cow waste of the Exfarm's Animal Husbandry Faculty at University of Jenderal Soedirman, Purwokerto. The research used experiment method and the parameters observed were the genus of bacteria which produce protease and the activity of protease. The characterizations of protease were determination of optimum pH and temperature, the influence of metal ions, EDTA, surfactant, and commercial detergent toward enzyme activity, and also the study of enzyme stability. The results from the research showed that the isolated bacteria from the Exfarm's of Animal Husbandry Faculty of UNSOED, which produced protease was *Salmonella* sp. Characterization of isolated *Salmonella* sp. from 45% ammonium sulphate fraction indicated that the optimum temperature was 50 °C, optimum pH was 8, the enzyme was activated by Ca^{2+} dan Mg^{2+} ion, whereas it was inhibited by Zn^{2+} , Cu^{2+} ions and EDTA. The addition of Tween-80 with the concentration of 0.2% and 0.4% increased protease activity, however the addition of Tween-80 with concentration higher than 0.6% decreased the protease activity. Enzyme protease from isolated *Salmonella* sp. was relatively stable with the addition of commercial detergent such as Attack, Surf, and Bukrim.

Keyword : Protease, milk cow waste, detergent industry.

PENDAHULUAN

Fakultas Peternakan UNSOED mengelola peternakan sapi yang menghasilkan limbah dan ditampung dalam tanki penampungan limbah. Selama ini limbah tersebut belum dimanfaatkan secara optimum. Salah satu alternatif pemanfaatan limbah tersebut adalah sebagai sumber mikroorganisme penghasil protease. Hal ini karena limbah tersebut mengandung nutrisi yang berpotensi sebagai medium pertumbuhan mikroorganisme penghasil protease.

Protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri. Secara komersial protease menduduki urutan tertinggi di antara enzim lainnya dan mencakup lebih dari 60% total penjualan enzim (Adinaraya, dkk., 2003). Kebutuhan

protease di Indonesia hampir 100% berasal dari impor. Akhir-akhir ini penggunaan protease alkalin semakin meningkat di dalam berbagai proses industri seperti di dalam industri detergen. Industri detergen memerlukan enzim dengan pH tinggi, rentang suhu luas dan stabil terhadap senyawa-senyawa yang terkandung dalam detergen seperti surfaktan, agen pemutih, aktivator pemutih, pelembut serat dan bahan lainnya (Noguiera, 2006).

Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi dan karakterisasi protease bakteri dari limbah sapi perah. Karakterisasi protease meliputi penentuan pH dan suhu optimum, penentuan pengaruh ion logam, EDTA, surfaktan, dan detergen komersial

terhadap aktivitas enzim serta uji stabilitas enzim.

METODE PENELITIAN

Materi utama dari penelitian ini adalah limbah sapi perah dari Exfarm Fakultas Peternakan Unsoed Purwokerto. Bahan yang digunakan adalah bakteri isolat hasil isolasi dari limbah sapi perah; medium NA (*Nutrient Agar*); medium NB (*Nutrient Broth*); skim milk, reagen TCA (asam trikloro asetat 0,11 M, natrium asetat 0,22 M, asam asetat 0,33 M); tirosin (0-100 $\mu\text{g/mL}$); substrat kasein (0,6 b/v) dalam buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; buffer pospat; buffer sitrat; buffer asetat; EDTA 10^{-3} M; akuades; CaCl_2 ; ZnCl_2 ; MgCl_2 ; FeSO_4 ; MnSO_4 ; SDS; Tween-80. Alat yang digunakan antara lain tabung reaksi, gelas ukur, cawan petri, pipet ukur, pipet mikro, gelas piala, labu erlenmeyer, autoklaf, *shaker incubator*, *hot plate*, sentrifugator, neraca analitik, pH meter, jarum ose, pipet mikro, labu pengenceran, dan spektrofotometer UV-Visible (*shimadzu*).

Pengambilan Sampel

Sampel limbah diambil 3 titik secara acak pada tangki penampungan limbah. Limbah dimasukkan ke dalam botol yang sudah disterilkan. Pengambilan sampel diawali dengan pengukuran suhu dan pH limbah tersebut secara *in situ*.

Isolasi Bakteri Penghasil Protease

Sampel tanah dibuat suspensi dengan menambahkan 2 gram sampel tanah pada 10 mL aquades steril, kemudian sebanyak 0,1 mL suspensi ditambahkan pada medium NA dengan cara sebaran. Inkubasi dilakukan selama 2x24 jam pada suhu sesuai habitat asalnya, selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada medium NA. Koloni yang menunjukkan kenampakan yang berbeda ditumbuhkan pada medium NA secara

goresan dan diinkubasi pada suhu sesuai habitat asalnya selama 2x24 jam untuk mendapatkan isolat murni (koloni tunggal).

Penapisan Kualitatif

Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein ditandai dengan pembentukan zona jernih, caranya satu ose koloni digoreskan pada medium SMA pH 9. Piaraan diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan habitat asal selama 2x24 jam dan diamati terbentuknya zona jernih pada masing-masing koloni. Koloni yang membentuk zona jernih merupakan penghasil protease dan digunakan untuk penelitian selanjutnya meliputi identifikasi isolat bakteri, penentuan kurva produksi, ekstraksi, fraksinasi, dan karakterisasi enzim protease.

Identifikasi Bakteri

Identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman Purwokerto

Pembuatan Inokulum

Inokulum dibuat dengan memindahkan isolat bakteri penghasil protease dari medium agar steril ke dalam 25 mL medium NB menggunakan jarum ose secara aseptis dan dikocok (dengan *shaker*) selama 1x24 jam pada suhu sesuai habitat asal.

Penentuan Waktu Produksi Optimum dan Fase Pertumbuhan Bakteri

Inokulum sebanyak 10% dimasukkan ke dalam medium NB dan diinkubasi. Waktu produksi optimum enzim dan fase pertumbuhan bakteri ditentukan berturut-turut dengan melakukan uji aktivitas ekstrak kasar medium dan mengukur kekeruhan menggunakan panjang gelombang 600 nm pada jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, dan 48. Data yang diperoleh dibuat

grafik dan waktu produksi optimum yang didapat digunakan untuk produksi enzim protease pada penelitian selanjutnya.

Produksi Protease

Produksi protease dilakukan dengan cara memindahkan 10-15% biakan bakteri dari medium inokulum ke dalam medium NB. Medium produksi selanjutnya diinkubasi selama waktu produksi optimum pada suhu sesuai habitat asal.

Ekstraksi Protease

Bakteri hasil biakan pada medium produksi dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, dalam keadaan dingin suhu 4 °C, sehingga diperoleh endapan dan supernatan. Supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim protease ekstraseluler dan selanjutnya dilakukan fraksinasi.

Fraksinasi Protease

Ekstrak kasar medium diukur volumenya, ditambah x gram amonium sulfat sampai konsentrasi akhir 15% (b/v), kemudian disentrifugasi. Supernatan ditampung, sedangkan endapan yang tertinggal dilarutkan dengan 5 mL NaCl 1% (b/v) dan disimpan pada suhu 4 °C sebagai fraksi endapan 15% (FE-15%). Supernatan ditambahkan lagi amonium sulfat sampai konsentrasi akhir 30% dan disentrifugasi lagi. Supernatan ditampung, sedangkan endapan yang tertinggal dilarutkan dengan 5 ml NaCl 1% (b/v) dan disimpan pada suhu 4 °C sebagai fraksi endapan 30% (FE-30%). Hal yang sama dilakukan dengan konsentrasi akhir amonium sulfat 45% dan 60%, sehingga diperoleh fraksi endapan 15%, 30%, 45%, 60% dan fraksi supernatan 60% (FE-15%, FE-30%, FE-45%, FE-60% dan FS-60%). Fraksi-fraksi tersebut kemudian didialisis.

Dialisis Hasil Fraksinasi (Bollag, et. al., 1996)

Hasil fraksinasi yang mengandung garam, didialisis menggunakan kantong selofan dengan akuades sebagai cairan pencuci. Fraksi-fraksi tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan diikat bagian atas dan bawahnya. Dialisis dilakukan pada suhu 4 °C sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan penggantian akuades setiap 30 menit hingga larutan enzim tidak mengandung garam. Fraksi-fraksi hasil dialisis yang diperoleh diuji aktivitas dan kadar proteinnya. Fraksi hasil dialisis yang memiliki aktivitas tertinggi ditentukan pH optimum, suhu optimum, pengaruh ion-ion logam (CaCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, dan FeSO₄, MnSO₄), EDTA, surfaktan, dan detergen komersial terhadap aktivitas enzim serta uji stabilitas enzim.

Uji Aktivitas Protease (Fuad dkk, 2004)

Aktivitas proteolitik protease diukur dengan metode Kunitz yang dimodifikasi. Sebanyak 0,5 mL substrat kasein (0,6 b/v) dalam buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 diprainskubasi pada suhu 45 °C selama 5 menit. Reaksi enzim dimulai dengan menambahkan 0,1 mL ekstrak enzim ke dalam substrat dan diinkubasi pada suhu 45 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 mL TCA (asam trikloroasetat 0,11 M, Naasetat 0,22 M, asam asetat 0,33 M) dalam keadaan dingin. Campuran uji dibiarkan mengendap selama 30 menit lalu disentrifugasi 4000 rpm 4 °C selama 15 menit. Peptida terlarut dalam supernatan hasil hidrolisis diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 275 nm. Larutan kontrol dibuat dengan perlakuan sama, tetapi substrat ditambah TCA terlebih dahulu baru kemudian ditambah larutan enzim. Larutan tirosin (0-100 µg/mL) digunakan sebagai standar untuk pengukuran

aktivitas proteolitik. Satu unit aktivitas protease (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 µg tirosin/menit/mL larutan enzim dari substrat kasein pada kondisi pengujian tersebut.

Penetapan Suhu Optimum Enzim

Prosedur kerja penetapan suhu optimum enzim sama seperti pada uji aktivitas tetapi dengan variasi suhu yaitu pada suhu 30 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, dan 70 °C.

Penentuan pH Optimum

Prosedur kerja penetapan pH optimum enzim sama seperti pada penetapan suhu optimum, tetapi dengan variasi pH. Variasi pH yang dilakukan adalah 6, 7, 8, 9, dan 10 pada suhu optimum. Substrat yang digunakan adalah kasein 0,6% (b/v).

Penentuan Pengaruh Ion Logam dan EDTA

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease ditentukan dengan cara menambahkan ion logam ke dalam larutan sampel saat uji aktivitas pada pH dan suhu optimum. Ion logam yang digunakan adalah CaCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, dan FeSO₄, MnSO₄, masing-masing dengan konsentrasi akhir 10⁻³ M, selanjutnya diuji aktivitasnya menggunakan metode Kunitz yang dimodifikasi. Penentuan pengaruh EDTA terhadap aktivitas protease ditentukan dengan cara menambahkan EDTA dengan konsentrasi akhir 10⁻² M ke dalam larutan sampel pada saat uji aktivitas pada pH dan suhu optimum.

Penentuan Pengaruh Surfaktan (Noguiera, *et al.*, 2006).

Pengaruh surfaktan terhadap aktivitas protease diuji dengan cara menambahkan Sodium Dodesil Sulfat (SDS) dan Tween-80 pada variasi konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0% ke

dalam larutan sampel, selanjutnya diinkubasi pada suhu dan pH optimum. Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan metode Kunitz yang dimodifikasi.

Penentuan Pengaruh Detergen Komersial terhadap stabilitas enzim (Jaswal and Kocher, 2007)

Detergen yang digunakan adalah detergen komersial yang ada di pasaran. Detergen dilarutkan dengan air sesuai petunjuk pemakaian yang tertera pada bungkusnya. Uji dilakukan dengan menambahkan 0,9 mL detergen pada 0,1 mL enzim kemudian diinkubasi selama 8 jam dengan sampling setiap 30 menit untuk diuji aktivitas sisanya dengan metode Kunitz yang dimodifikasi. Kontrol digunakan prosedur yang sama tanpa penambahan detergen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Penghasil Protease

Bakteri penghasil protease diisolasi dari limbah tanki penampungan limbah pada suhu 35 °C dan pH 8 saat pengukuran secara *insitu*. Sampel limbah yang berupa tanah dibuat suspensi kemudian ditumbuhkan pada medium cawan *Nutrient Agar* (NA) secara *spread plating*. Isolat bakteri yang memiliki kenampakan berbeda pada medium cawan NA kemudian dipindahkan ke medium NA baru dengan metode cawan gores kuadran, sehingga diperoleh biakan murninya.

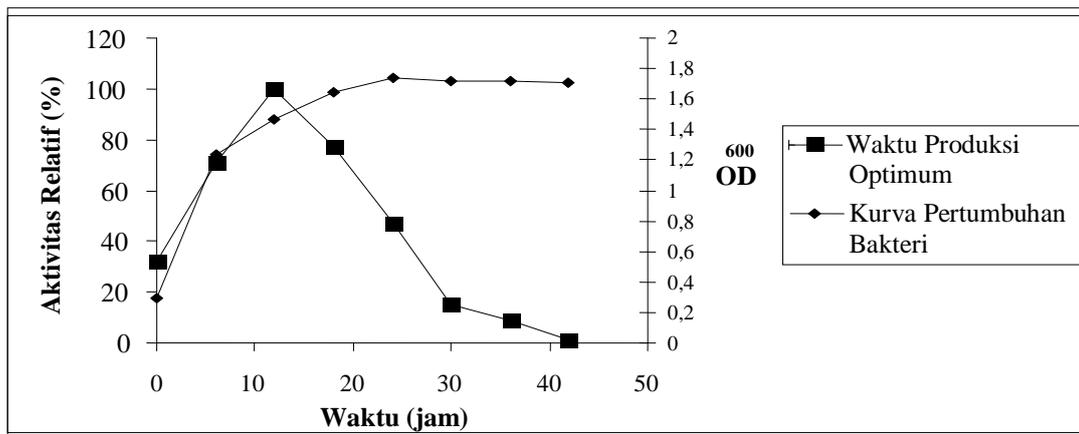
Dari hasil penelitian didapat delapan isolat biakan murni yang kemudian diberi kode LT (Limbah Ternak), yaitu LT 1, LT 2, LT 3, LT 4, LT 5, LT 6, LT 7, dan LT 8. Masing-masing isolat kemudian diuji proteolitik pada medium SMA (*Skim Milk Agar*) pH 8. Isolat yang positif menghasilkan protease ditandai dengan terbentuknya zona jernih di sekeliling koloni. Zona jernih yang terbentuk menunjukkan

bahwa bakteri menggunakan susu skim yang terdapat pada medium sebagai nutriennya.

Isolat-isolat bakteri yang positif penghasil protease kemudian diuji aktivitasnya dengan metode Kunitz yang dimodifikasi. Isolat bakteri yang mempunyai aktivitas proteolitik tertinggi adalah LT 7 dengan aktivitas sebesar 0,3058 U/mL yang selanjutnya diidentifikasi. Berdasarkan hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat bakteri LT 7 adalah jenis bakteri yang termasuk ke dalam genus *Salmonella* sp (data tidak ditampilkan).

Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Protease dan Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri *Salmonella* sp.

Produksi ekstrak kasar enzim protease dilakukan dengan mengekstraksi medium produksi yang telah ditumbuhi isolat bakteri *Salmonella* sp. pada waktu produksi optimumnya. Pengukuran waktu produksi optimum enzim protease dan fase pertumbuhan isolat bakteri *Salmonella* sp dilakukan selama 42 jam dan dianalisis setiap 6 jam. Waktu produksi optimum enzim dapat diketahui dengan mengukur aktivitas ekstrak kasar enzim proteasenya. Fase pertumbuhan bakteri ditentukan dengan mengukur kekeruhan medium produksi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Kurva hasil pengukuran uji aktivitas relatif enzim protease dan kekeruhan medium produksi terhadap selang waktu dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Waktu produksi optimum protease dan kurva pertumbuhan isolat bakteri *Salmonella* sp.

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 1 dapat diketahui bahwa aktivitas relatif protease semakin meningkat dengan bertambahnya waktu dan mencapai optimum pada jam ke-12 dengan aktivitas relatif mencapai 100%. Hal ini menunjukkan bahwa waktu produksi optimum enzim protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp adalah 12 jam. Waktu produksi optimum ini digunakan sebagai waktu produksi enzim protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp. Waktu

produksi optimum protease terjadi pada fase eksponensial akhir dari kurva pertumbuhan isolat bakteri *Salmonella* sp. Menurut Dodia *et al.* (2006) waktu produksi optimum protease alkalin dari isolat bakteri S₅ yang diisolasi dari Coastal Gujarat, India juga terjadi pada akhir fase eksponensial.

Fraksinasi Protease dari Isolat Bakteri *Salmonella* sp dengan Amonium Sulfat

Fraksinasi dengan amonium sulfat merupakan salah satu cara pemurnian

protein melalui proses pengendapan garam. Penambahan garam amonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadinya kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting*

out. Fraksinasi amonium sulfat dilakukan dengan konsentrasi 15, 30, 45, dan 60 % jenuh. Hasil pemurnian protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp terlihat dalam Tabel 1.

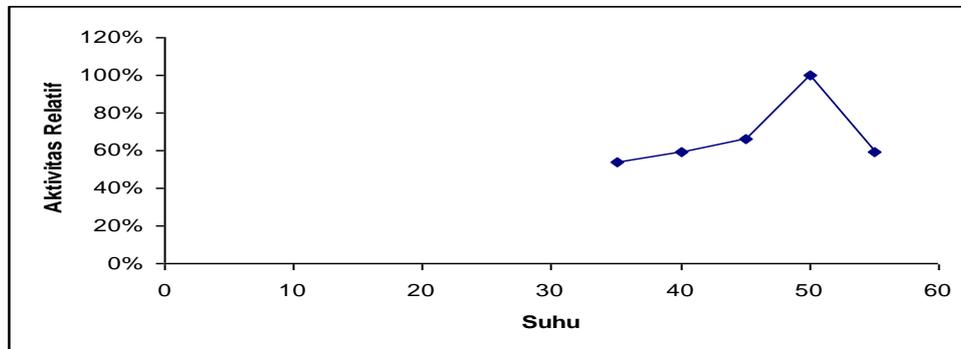
Tabel 1. Hasil fraksinasi protease dengan amonium sulfat

Tahap pemurnian	Unit Aktivitas (U/mL)
Ekstrak Kasar	0,6135
Fraksi 15%	0,2521
Fraksi 30%	0,8271
Fraksi 45%	1,4208
Fraksi 60%	0,7813

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa fraksi 45% jenuh mempunyai aktivitas protease tertinggi, dengan aktivitas spesifik 1,4208 U/mL, sehingga fraksi 45% jenuh dikarakterisasi lebih lanjut yang meliputi penentuan suhu optimum, pH optimum, pengaruh logam dan EDTA, pengaruh surfaktan (SDS dan Tween-80), serta kestabilannya terhadap detergen komersial.

Karakterisasi Protease Hasil Fraksinasi Suhu Optimum

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi aktivitas enzim. Hasil penentuan suhu optimum enzim protease fraksi 45% dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp.

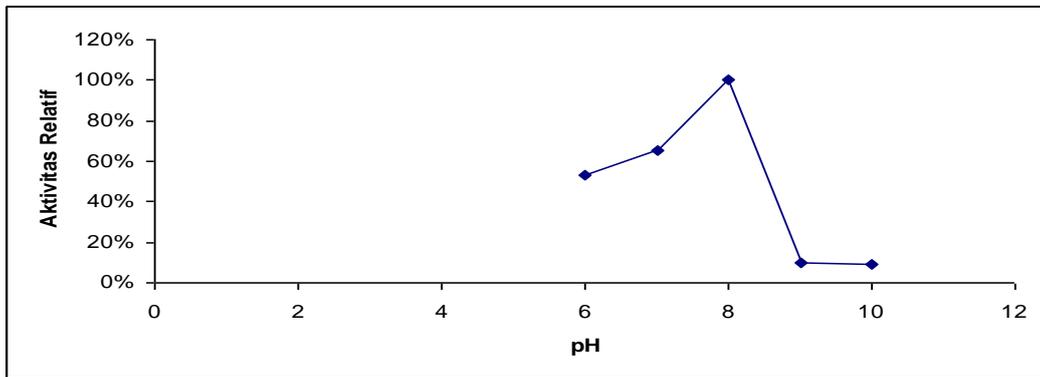
Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 2 semakin tinggi suhu maka aktivitas enzim juga akan meningkat sampai terjadi suhu optimum. Aktivitas enzim protease mencapai aktivitas optimum pada suhu 50 °C. Aktivitas protease terus meningkat sampai mencapai suhu optimum disebabkan oleh kenaikan energi kinetik molekul enzim dan juga meningkatnya gerakan molekul-molekul

substrat sehingga peluang terjadinya tumbukan antara molekul enzim dan substrat semakin besar. Hal ini mengakibatkan semakin besar pula peluang molekul enzim berikatan dengan substrat sehingga produk yang dihasilkan semakin banyak. Aktivitas enzim juga akan menurun pada suhu di atas suhu optimum. Hal ini disebabkan suhu tinggi akan memecah ikatan-ikatan sekunder seperti ikatan hidrogen yang

mempertahankan enzim pada struktur alamiahnya, sehingga struktur sekunder, tersier enzim rusak secara partial diikuti dengan menurunnya aktivitas (Roosdiana, dkk., 2002).

pH Optimum

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas protease adalah pH. Hasil penentuan pH optimum protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp. dapat dilihat pada Gambar 3.



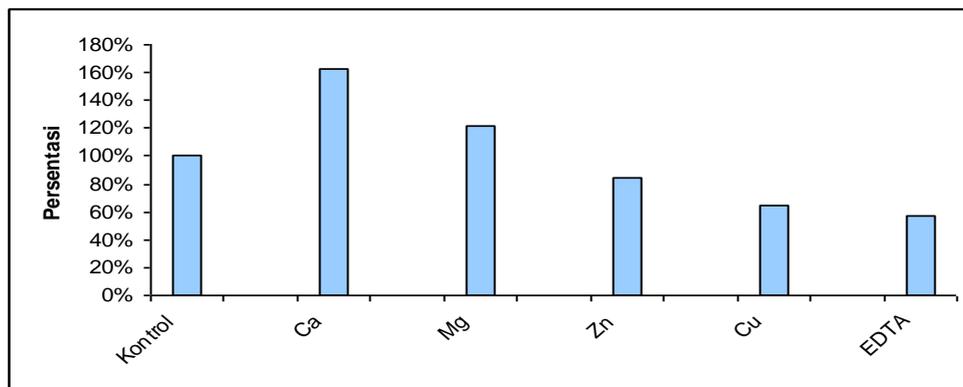
Gambar 3. Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp.

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa aktivitas optimum protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp terjadi pada pH 8. Protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp. termasuk alkalin protease karena aktif pada pH alkalin dan dapat diaplikasikan pada industri detergen. pH optimum yang sama juga dimiliki oleh protease yang diisolasi dari bakteri *Bacillus* sp. (Naiola dan

Widhyastuti, 2007) dan bakteri termofilik *Bacillus* sp. (Nascimento and Martins, 2003).

Pengaruh Penambahan Ion Logam dan EDTA

Pengaruh Penambahan ion logam dan EDTA terhadap aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp. dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh penambahan ion logam dan EDTA terhadap aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp.

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 4 aktivitas

relatif protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp. turun menjadi

58% dengan penambahan EDTA, sehingga protease tersebut termasuk protease logam. Protease logam membutuhkan ion logam untuk aktivitas optimalnya, dan aktivitasnya akan diinhibisi dengan adanya agen pengkelat logam, seperti EDTA (Yang, *et al.*, 2000)

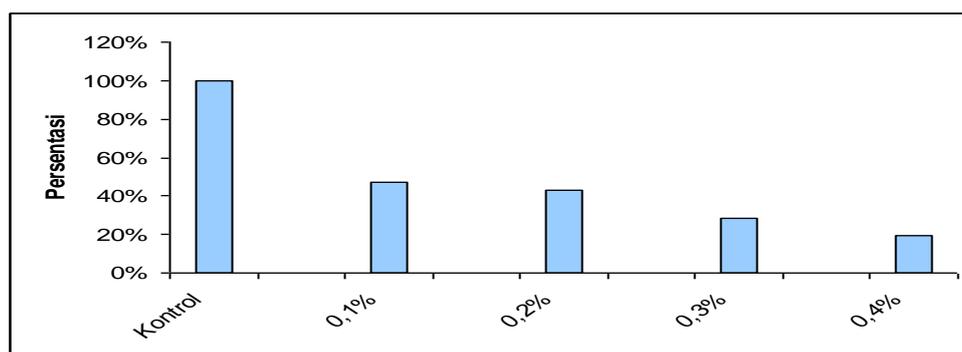
Penambahan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} pada enzim protease dari isolat bakteri *Salmonella sp.* dapat meningkatkan aktivitas relatif enzim menjadi 162% untuk ion Ca^{2+} dan 122% untuk ion Mg^{2+} . Data yang dihasilkan tersebut menunjukkan bahwa protease dari isolat *Salmonella sp.* membutuhkan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} untuk meningkatkan aktivitasnya. Menurut Kamelia, dkk. (2005) ion logam Ca^{2+} dan Mg^{2+} berperan pada hidrolisis protein yaitu membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan residu asam amino dari protease dan bersifat sebagai akseptor elektron (asam Lewis) sehingga mampu berinteraksi dengan basa yaitu gugus OH dari molekul air.

Ion logam disamping berperan sebagai aktivator dapat juga berperan sebagai inhibitor. Dari hasil penelitian, logam Cu^{2+} dan Zn^{2+} berperan sebagai

inhibitor enzim protease karena mampu menghambat aktivitas protease fraksi 45% sehingga aktivitas relatif menurun masing-masing menjadi 65% dan 85% pada penambahan logam Cu^{2+} dan Zn^{2+} .

Pengaruh Penambahan Surfaktan (SDS dan Tween-80)

Surfaktan merupakan zat yang berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan suatu cairan. Surfaktan menurunkan tegangan permukaan air dengan memutuskan ikatan-ikatan hidrogen antar molekul air pada permukaan air. Proses penurunan tegangan permukaan terjadi dengan cara gugus-gugus hidrofilik dari surfaktan mendekati permukaan air dan gugus-gugus hidrofobiknya terentang menjauhi permukaan air (Fessenden dan Fessenden, 1982). Surfaktan terbagi menjadi 3 jenis, yaitu surfaktan anionik seperti SDS (Sodium Dodesil Sulfat), surfaktan non ionik seperti Tween-80, dan surfaktan kationik. Pengaruh penambahan surfaktan SDS dan Tween 80 terhadap aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella sp.* dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.



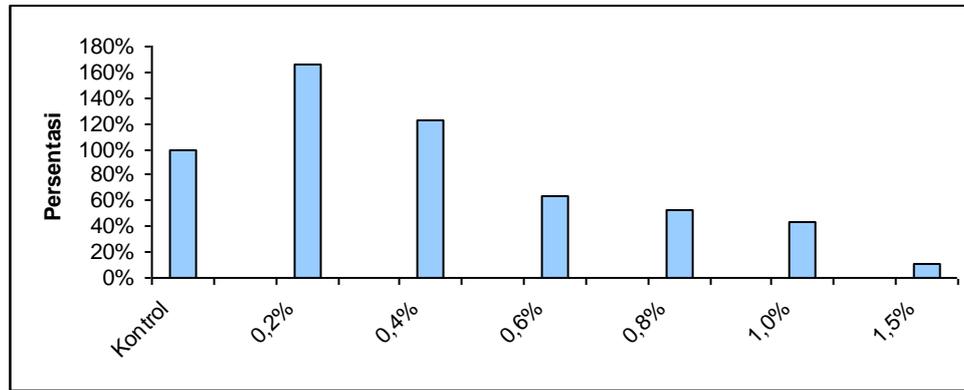
Gambar 5. Pengaruh penambahan SDS terhadap aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella sp.*

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 6 aktivitas relatif protease dari isolat bakteri *Salmonella sp.* tersisa 47% dengan penambahan 0,1% SDS. Semakin besar konsentrasi SDS yang ditambahkan maka

aktivitas protease semakin hilang. Hal ini menunjukkan bahwa protease dari isolat bakteri *Salmonella sp.* tidak tahan terhadap adanya surfaktan jenis anionik seperti SDS. Aktivitas protease dapat menurun dengan penambahan SDS

karena kepala hidrofilik SDS yang bersifat anionik dapat mengubah muatan residu asam amino enzim protease dan memutuskan ikatan hidrogen pada protein enzim sehingga konformasi aktif protease berubah. Joo, *et al.*, (2003)

melaporkan bahwa dengan penambahan SDS 5% maka aktivitas protease dari *B. clausii* tersisa 72,6%, sedangkan protease dari *P. Aeruginosa* PD100 kehilangan aktivitasnya sebesar 50% (Najafi, *et al.*, 2005).



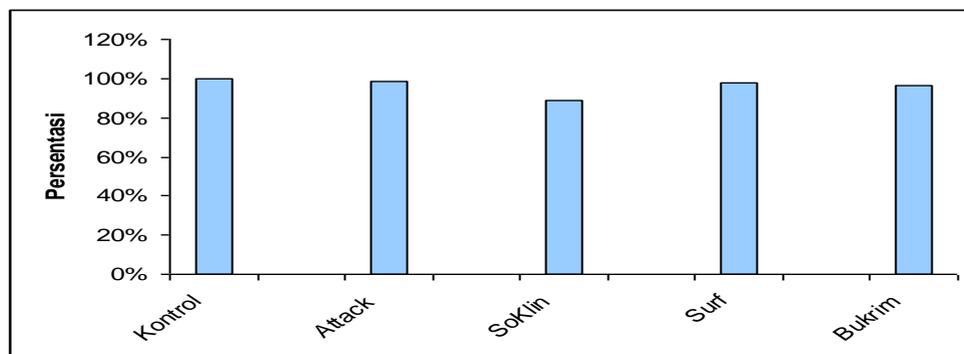
Gambar 6. Pengaruh penambahan Tween-80 terhadap aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp.

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 7 aktivitas relatif protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp. meningkat menjadi 165% dan 123% dengan penambahan masing-masing 0,2% dan 0,4% Tween-80. Aktivitas protease kemudian menurun menjadi 64% dengan penambahan 0,6% Twen-80. Penambahan Twen-80 dengan konsentrasi yang lebih besar dari 0,6% membuat aktivitas relatif protease semakin menurun. Hal ini menunjukkan bahwa protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp. relatif lebih tahan terhadap surfaktan jenis non anionik

seperti Tween-80 pada konsentrasi sekitar 0,2 – 0,4%.

Kestabilan Protease dengan Penambahan Detergen Komersial

Kestabilan protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp dengan penambahan detergen komersial ditentukan dengan melihat besarnya perubahan aktivitas protease setelah diinkubasi pada kondisi optimumnya. Kestabilan protease dari isolat bakteri *Salmonella* sp dengan penambahan detergen komersial dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kestabilan protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp. dengan penambahan detergen komersial

Protease yang diaplikasikan pada industri detergen harus stabil terhadap keberadaan detergen komersial. Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 7 dapat diketahui bahwa aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp. dengan penambahan detergen Attack, Soklin, Surf, dan Bukrim masing-masing adalah 98%, 89%, 98% dan 96%. Aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp. relatif stabil dengan penambahan detergen Attack, Surf, dan Bukrim. Aktivitas protease fraksi 45% dari isolat bakteri *Salmonella* sp. relatif menurun dengan penambahan detergen Soklin.

KESIMPULAN

1. Genus bakteri penghasil protease yang diisolasi dari limbah ternak *Exfarm* Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman adalah *Salmonella* sp.
2. Karakteristik protease fraksi 45% amonium sulfat dari isolat *Salmonella* sp. memiliki suhu optimum 50 °C, pH optimum 8, diaktivasi oleh ion logam Ca^{2+} dan Mg^{2+} , serta diinhibisi oleh ion logam Zn^{2+} , Cu^{2+} , dan EDTA. Penambahan SDS menurunkan aktivitas protease. Penambahan Tween-80 dengan konsentrasi 0,2 dan 0,4% meningkatkan aktivitas protease, sedangkan penambahan Tween-80 dengan konsentrasi $\geq 0,6\%$ menurunkan aktivitas protease.
3. Protease dari isolat *Salmonella* sp. relatif stabil pada penambahan detergen komersial merk Attack, Surf, dan Bukrim.

DAFTAR PUSTAKA

Adinarayana, K., P. Ellaiah, and D.S. Prasad. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated

Bacillus subtilis PE-11. *AAPS PharmSchiTech.* 2003;4(4): article 56.

Bollag, D. M., M. D. Rozycki and S. I. Edelstein. 1996. *Protein Methods 2nd Ed.* John Willey and Sons. New York.

Dodia, M.S., R.H. Joshi, R.K. Patel, and S.P. Singh. 2006. Characterization and Stability of Extracellular Alkaline Protease from Halophilic and Alkaliphilic Bacteria Isolated from Saline Habitat of Coastal Gujarat, India. *Brazilian Journal of Microbiology.* 37:276-282.

Fessenden, R.J. dan J.S. Fessenden. 1982. *Kimia Organik Jilid 2.* Erlangga. Jakarta.

Fuad, A.M., R. Rahmawati, N.R. Mubarik. 2004. Produksi dan Karakterisasi Parsial Protease Alkali Termotabil *Bacillus Thermoglucosidasius* AF-01. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia:* No 1 ISSN 0853-358X volume 9.

Jaswal, R.K., G.S. Kocher. 2007. Partial Characterization of a Crude Alkaline Protease From *Bacillus circulans* and Its Detergen Compatibility. *Journal of Microbiology.* 2007. Volume 4 Number 1.

Joo, H.S., C.G. Kumar, G.-C. Park, S.R. Paik, and C.-S. Chang. 2003. Oxidant and SDS-Stable Alkaline Protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and Some Properties. *Journal of Applied Microbiology,* 95, 267-272.

Kamelia, R., Sindumarta dan D. Natalia. 2005. Isolasi dan Karakterisasi

- Protease Intraselular Termostabil dari Bakteri *Bacillus sterothermophilus* RP1. Makalah disampaikan dalam Seminar Nasional FMIPA UI. Depok, 24-26 November 2005.
- Najafi, M.F., D. Deobagkar, and D. Deobagkar. 2005. Potential Application of Protease Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 8, No. 2.
- Naiola, E dan N. Widhyastuti. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus sp.* Berk. *Penel. Hayati: 13 (51-56)*.
- Nascimento, W.C.A., and M.L.L.Martins. 2003. Production and Properties of An Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus sp.* *Brazillian Journal of Microbiology*, 35, 91-96.
- Nogueira, E., U. Beshay, and A. Moreira. 2006. *Characteristics of Alkaline Protease Enzyme Produce by Teredinobacter turnirae and Its Potential Application as A Detergent Additive.* *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 102, Heft 5, 2006.
- Roosdiana, A., H. Kartikaningsih, Suharjono, R. Peranginangin, dan Murdinah. 2002. Isolasi dan Karakterisasi *Bacillus sp* Penghasil Protease dari Kulit Ikan Kakap Merah (*Lutjanus sanguineus*). *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (Life Sciences)*. Vol.14, No.2.
- Yang, J.-K., I.-L. Shih, Y.-M. Tzeng, S.-L. Wang. 2000. Production and Purification of Protease from *Bacillus subtilis* That Can Deproteinize Crustacean Wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 406-413.