



## **PEMURNIAN EKSTRAK KASAR PROTEASE *BACILLUS MEGATERIUM* TR-10 DENGAN METODE PENGENDAPAN ASETON**

**Salma Afifah<sup>1</sup>, Vivi Mulya Harum<sup>1</sup>, dan Evi Susanti<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Prodi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang

<sup>2</sup>Prodi Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang  
e-mail: \*evi.susanti.fmipa@um.ac.id

### **Abstrak**

*Protease merupakan enzim yang paling banyak dibutuhkan di dunia industri karena kemampuannya sebagai katalis, memiliki daya katalitik dan spesifitas tinggi, dapat bekerja pada kondisi suhu dan pH yang tidak ekstrim serta aktivitas katalitiknya yang mudah dikendalikan dan ramah lingkungan. Protease dapat diproduksi dari hasil isolasi tumbuhan, hewan dan mikroba. Namun, bakteri merupakan sumber protease yang potensial karena mudah diproduksi dalam skala besar, biaya produksi yang cukup terjangkau, serta dapat dibudidayakan dalam jumlah besar dalam waktu yang relatif singkat dengan cara yang telah ditetapkan. Salah satu bakteri yang berpotensi menghasilkan protease adalah *Bacillus megaterium* TR-10. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan ekstrak kasar protease dari *B. Megaterium* TR-10 dengan metode pengendapan aseton. Protease dihasilkan dengan meremajakan bakteri pada media susu skim agar (SSA), produksi bakteri pada media produksi, uji aktivitas dan kadar protein, pemurnian ekstrak kasar protease dengan aseton pada berbagai fraksi diantaranya FA-I (33%), FA-II (41%), FA-III (50%), FA-IV (60%), FA-V (67), kemudian uji homogenitas protein dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar aseton maka kadar protein akan semakin tinggi, tetapi tidak demikian dengan aktivitas spesifik enzim. Masing-masing fraksi pada kejenuhan 33%, 41%, 50%, 60%, 67% menghasilkan aktivitas spesifik 22,6 U/mg, 25,4 U/mg, 40,2 U/mg U/mg, 47,8 U/mg, 20,0 U/mg. Hal ini dikuatkan dengan hasil uji homogenitas SDS-PAGE yang semakin menurun. Maka dapat disimpulkan bahwa pemekatan ekstrak kasar protease *B. megaterium* TR-10 dengan metode pengendapan aseton memiliki kadar optimum pada kejenuhan aseton 60% dengan peningkatan kemurnian sebesar 1.6 kali lipat dan yield protein 0.066%.*

**Kata Kunci:** *Protease, Bacillus megaterium* TR-10, Pemurnian, Aseton.

### **1. PENDAHULUAN**

Enzim protease merupakan enzim yang banyak diaplikasikan di dunia industri seperti industri kulit, makanan, minuman, farmasi, pertanian hingga kosmetik [1][2]. Menurut Kepala Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), kebutuhan protease di Indonesia mencapai 200 juta ton per tahun, 99% diantaranya bergantung pada impor dari beberapa negara [3]. Seiring meningkatnya kebutuhan protease di dunia industri dan untuk meminimalisir impor enzim dalam negeri, para peneliti melakukan penelitian untuk mendapatkan sumber-sumber protease baru [4] dengan harapan dapat menyediakan protease secara mandiri.

Enzim protease tersebar luas pada beberapa sumber hayati, yakni dapat diproduksi dari hasil isolasi tumbuhan, hewan dan mikroba. Protease paling banyak ditemukan pada tumbuhan yakni (43,85%), sumber kedua terbanyak penghasil protease adalah bakteri (18,09%), jamur (15,08%), hewan (11,15%), alga (7,42%) dan yang terakhir virus (4,41%). Namun, diantara sumber-sumber protease yang ada, bakteri merupakan sumber protease yang memiliki keunggulan diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, biaya produksi yang cukup terjangkau, serta dapat dibudidayakan dalam jumlah besar dalam waktu yang relatif singkat dengan cara yang telah ditetapkan [5][6]. Salah satu bakteri yang berpotensi menghasilkan protease adalah *Bacillus megaterium* TR-10. Bakteri ini merupakan hasil isolasi

dari terasi sidoarjo dan tergolong sebagai bakteri nonpatogen [7] yang memiliki indeks proteolitik tinggi, yakni sebesar 3,00 [8].

## 2. METODE

### 2.1 Bahan Percobaan

NaCl, NaOH, susu skim, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, folin ciocalteu, glukosa, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, bactopecton, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, TCA 10%, kasein, akuades, HCl 1 M, spiritus, etanol 70%, baktoagar, H<sub>2</sub>O, Acrylamide, Tris-HCL pH 8,8 1,5 M, Tris-HCL pH 6,8 0.5 M, SDS 10%, TEMED, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10%, Laemmli sample buffer, β-mercaptoethanol, Running Buffer Tris-Glycine-SDS, dan Marker Protein.

### 2.2 Alat Percobaan

Cawan petri, lampu spiritus, batang pengaduk, tabung reaksi, labu takar, erlenmeyer, tabung sentrifuge 50 mL, gelas beaker, termometer, gelas arloji. Adapun peralatan non gelas diantaranya: kuvet, *magnetic stirrer*, mikro pipet 10, 100 dan 1000 μL, *microtube* 2 mL, *microtube* 1,5 mL, *blue tip*, *yellow tip*, kawat ose ujung lingkaran, kapas, tissue, karet gelang, plastik wrap, korek api, kertas coklat, pH meter, hot plate, indikator universal, lemari es, autoklaf (*Tony*), oven (*Memmert*), *waterbath incubator* (*Memmert*), neraca analitik (*Precisa XT 120 A*), Spektrofotometer (*Spectrofotometer Spectronic 20 50DA*), vortex (*Dargon Lab MX-5*), *Thermo Scientific Waterbath* (*Shaker Inkubator*), Sentrifuse (*Tomy MX-105 High Speed Refrigerated Microcentrifuge*), *Laminar Air Flow*, *Mini-PROTEAN® Tetra Cell*, *PowerPac™ ower Supply*, *Heat Block*, dan *Gloves*.

### 2.3 Peremajaan Isolat Bakteri *Bacillus megaterium* TR-10

Stok gliserol di sebar pada cawan petri dengan media SSA (Susu Skim Agar) dalam cawan petri. Kemudian di inkubasi dalam inkubator selama ±24 jam pada suhu 37 °C. Hasil *spreading* diambil sebanyak 1 ose, lalu di *streak*  $\frac{3}{4}$  kuadran dengan media SSA dalam cawan petri dan di inkubasi pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Selanjutnya dilakukan pengecatan gram untuk mengkonfirmasi bahwa isolat yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *B. megaterium* TR-10.

### 2.4 Produksi Ekstrak Kasar Protease Dari *Bacillus megaterium* TR-10

Isolat bakteri *B. megaterium* TR-10 di inokulasikan ke media produksi yang mengandung susu skim, di inkubasi dalam *incubator shaker* pada 100 rpm dengan suhu 37 °C selama 72 jam, lalu di sentrifugasi pada 10.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit dan dihasilkan ekstrak kasar protease.

### 2.5 Pemurnian Ekstrak Kasar Protease dengan Metode Pengendapan Aseton

Ekstrak kasar protease ditambahkan aseton secara perlahan dengan berbagai perbandingan, Fraksi I (33%), II (41%), III (50%), IV (60%) dan V (67%), lalu disimpan di dalam freezer dalam waktu semalam. Setelah itu, disentrifuge pada 10.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 30 menit. Pellet yang terbentuk diambil dan dilarutkan menggunakan buffer fosfat pH 7 0,01 M. Kemudian, larutan yang terbentuk di uji aktivitas dan uji kadar protein.

### 2.6 Uji Aktivitas Protease Dari Bakteri *Bacillus megaterium* TR-10

Kultur biakan yang telah di inkubasi selama 72 jam di sentrifuge pada 10.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Ekstrak kasar protease diambil sebanyak 0,2 mL dan masing-masing dimasukkan kedalam tabung A (sampel) dan tabung B (kontrol), lalu ditambahkan 1 mL TCA 10% pada tabung B, lalu didiamkan selama 15 menit. Kemudian, tabung A dan B ditambahkan kasein 1% pH 8 sebanyak 0,5 mL dan didiamkan selama 10 menit. Lalu, di inkubasi pada suhu 50 °C selama 20 menit. Tahap selanjutnya yaitu menambahkan TCA 10% pada tabung A dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian, larutan yang terbentuk di sentrifuge kembali pada 10.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 0.85 mL dan ditambahkan 1.25 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> serta 0,5 folin ciocalteu, kemudian di diamkan selama 30 menit pada suhu kamar dalam ruang gelap. Tahap terakhir yaitu diukur

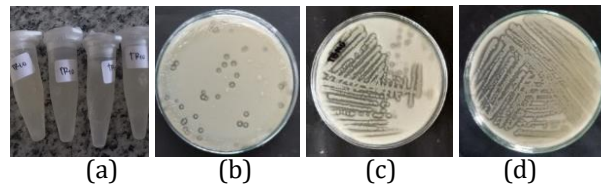
absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang ( $\lambda$ ) 660 nm dengan blanko larutan tirosin standar.

### 2.7 Penentuan Kadar Protein

Pengujian kadar protein pada penelitian ini menggunakan metode lowry. Kultur biakan yang telah di inkubasi selama 72 jam disentrifuge pada 10.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Kemudian supernatan diambil sebanyak 0.5 mL. setelah itu, ditambahkan 2,5 mL pereaksi biuret dan didiamkan selama 10 menit. Larutan yang terbentuk ditambah folin ciocalteu 0,25 mL, kemudian di diamkan selama 20 menit pada suhu kamar dalam ruang gelap. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang ( $\lambda$ ) 750 nm.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

*B. megaterium* TR-10 merupakan bakteri yang digunakan pada penelitian ini. Peremajaan bakteri dilakukan pada media susu skim agar (SSA) dengan teknik *streak*  $\frac{3}{4}$  kuadran. Media ini merupakan media yang efektif untuk mendeteksi protein yang terikat pada sel yang ditentukan oleh zona bening yang mengelilingi koloni. Zona bening yang terbentuk dari hasil hidrolisis kasein menunjukkan adanya kemampuan bakteri dalam menghasilkan protease [8]. *B. megaterium* TR-10 yang digunakan adalah hasil *spread* stok gliserol yang kemudian diremajakan pada media SSA. *Spreading* bakteri dari stok gliserol dilakukan untuk menghindari ketidakmurnian pada peremajaan sebelumnya. **Gambar 1.a** adalah stok gliserol yang disimpan pada freezer dengan suhu -18 °C. Selanjutnya stok gliserol disebar/*spread* pada media SSA **Gambar 1.b**, **Gambar 1.c** merupakan hasil *streak* dari stok gliserol dan **Gambar 1.d** adalah hasil peremajaan dari **Gambar 1.c**.



**Gambar 3.1** (a) Stok gliserol bakteri *B. megaterium* TR-10 (b) hasil *spread* dari stok gliserol bakteri *B. megaterium* TR-10 (c) Stok peremajaan bakteri *B. megaterium* TR-10 dan (d) Hasil peremajaan bakteri *B. megaterium* TR-10

Gambar 3.1d menunjukkan bahwa koloni yang terbentuk sudah seragam dan sesuai dengan penelitian [8] yaitu berbentuk bulat, berwarna putih, dan berukuran kecil. Konfirmasi selanjutnya dilakukan pengecatan gram bakteri dengan tujuan untuk mengkonfirmasi ulang bahwa bakteri yang digunakan adalah *B. megaterium* TR-10. Gambar 3.2 menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan merupakan bakteri gram negatif, dan berbentuk basil, yakni sesuai dengan penelitian [8]



**Gambar 3.2** Hasil pewarnaan gram dari stok gliserol isolat TR-10

Produksi ekstrak kasar protease merujuk pada penelitian dengan sumber nitrogen susu skim. Produksi protease dilakukan sebanyak 3 kali produksi dan memberikan hasil berbeda atau tidak konstan. Aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada produksi ke-3 dengan aktivitas sebesar 4,738 U/mL dan aktivitas enzim terendah diperoleh pada produksi ke-2 dengan

aktivitas sebesar 2,319 U/mL. Hal ini dapat disebabkan karena jumlah sel bakteri pada satu ose biakan yang diinokulasi ke media produksi jumlahnya tidak sama.

**Tabel 3.1** Aktivitas enzim protease dengan sumber nitrogen susu skim

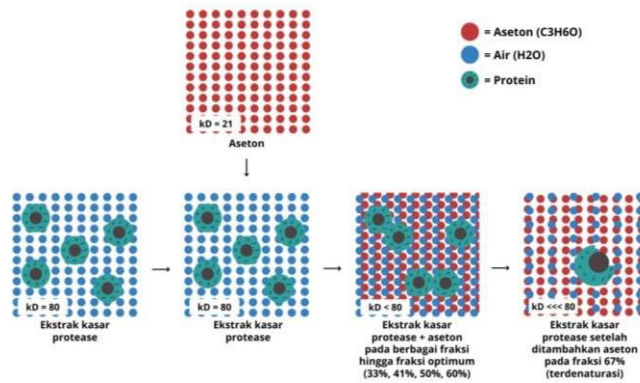
Waktu Produksi	Waktu Inkubasi Media Produksi	Aktivitas Enzim (U/mL)
11 Juli 2022	72 Jam	3,503
21 Juli 2022	72 Jam	2,319
21 Juli 2022	72 Jam	4,738

Tabel 3.2 menunjukkan bahwa tidak terjadi pola yang sama antara total protein dan total aktivitas protease. Total protein terus meningkat seiring bertambahnya konsentrasi aseton pada ekstrak kasar protease. Namun, aktivitas spesifik protease hanya meningkat pada kejenuhan aseton 33% (FA-I) hingga 60% (FA-IV) dan menurun pada kejenuhan aseton 67% (FA-V). Fraksi V mengalami penurunan aktivitas spesifik diduga karena aseton yang ditambahkan terlalu tinggi sehingga mengakibatkan nilai konstanta dielektrik larutan protein sangat rendah (non polar) sehingga memicu terjadinya denaturasi protein. FA-IV (60%) merupakan fraksi optimum pada penelitian ini. Fraksi ini berhasil memekatkan volume ekstrak kasar protease dari 16 mL menjadi 2 mL dan memiliki nilai unit aktivitas spesifik tertinggi sebesar 47,92 U/mL dengan tingkat kemurnian 1,6 kali lipat dan memperoleh nilai yield protein sebesar 0,066%.

**Tabel 3.2** Tingkat Kemurnian Ekstrak Kasar Protease Pada Berbagai Fraksi Aseton

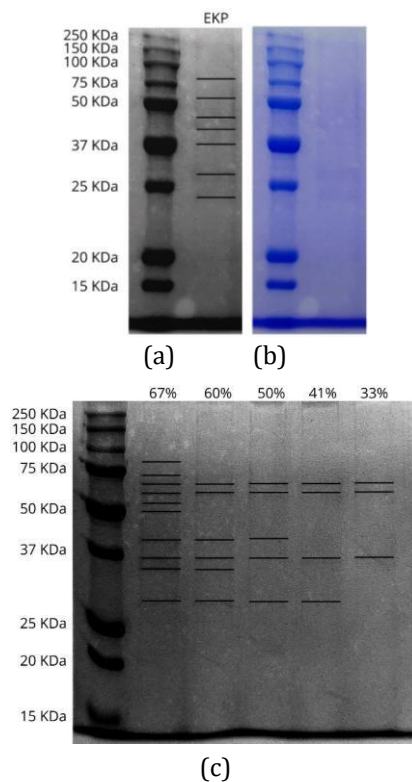
Fraksi	Vol Enzim (mL)	Total Aktivitas (U)	Kadar Protein (ppm)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian	Perolehan Kembali (%)
EKP	16	75.808	158.290	2.533	29.932		100
(33%)	2	1.550	34.290	0.068	22.602	0.7	0.020
(41%)	2	1.858	36.511	0.073	25.444	0.8	0.025
(50%)	2	3.094	38.511	0.077	40.170	1.3	0.041
(60%)	2	4.998	52.289	0.104	47.792	1.6	0.06
(67%)	2	2.578	64.289	0.128	20.050	0.7	0.034

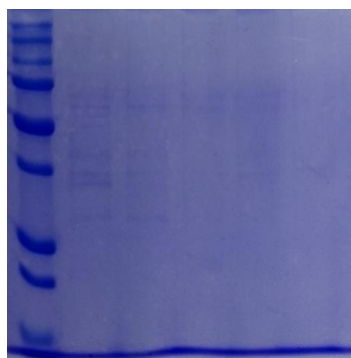
Aseton merupakan pelarut organik yang dapat menurunkan kepolaran suatu protein pada kejenuhan tertentu. Ketika aseton ditambahkan pada ekstrak kasar protease, aseton akan menurunkan kepolaran air pada larutan dan protein yang seharusnya dapat larut dalam air menjadi terendapkan karena interaksi antar protein yang meningkat. Namun, protein akan terdenaturasi akibat penambahan aseton yang semakin tinggi (diatas fase optimum) karena interaksi antar protein tidak dapat teratasi sehingga bagian hidrofobik pada struktur dalam protein terekspose keluar.



**Gambar 3.3** Ilustrasi penambahan aseton pada ekstrak kasar protease.

Uji kemurnian protease juga dilakukan dengan metode SDS-PAGE dengan konsentrasi gel 12%. Metode ini dilakukan untuk mengetahui homogenitas protein dan berat molekul suatu protein yang dibaca melalui pita yang terbentuk pada fraksi I – fraksi V. Gambar 3.4a menunjukkan bahwa ekstrak kasar protease memiliki 7 pita sebagai acuan atau kontrol protease setelah pemurnian, sedangkan Gambar 3.4c merupakan hasil SDS-PAGE ekstrak kasar protease setelah pemurnian dengan aseton. Sumur 1 (33%) memiliki 3 pita, sumur 2 (41%) 4 pita, sumur 3 (50%) 5 pita, sumur 3 (60%) 6 pita, dan sumur 5 (67%) 10 pita. Semakin tinggi konsentrasi aseton yang ditambahkan maka pita yang ditambahkan semakin menurun, yang menunjukkan homogenitas protein menurun. Hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi aseton maka struktur protein lebih mudah terdenaturasi sehingga lebih mudah mengalami hidrolisis.





(d)

**Gambar 3.4** (a) Hasil SDS-PAGE ekstrak kasar protease *B. megaterium* TR-10 (dokumentasi setelah diperjelas) (b) (dokumentasi asli) (c) Hasil SDS-PAGE ekstrak kasar protease pada berbagai fraksi aseton (dokumentasi setelah diperjelas) (d) (dokumentasi asli)

#### 4. SIMPULAN

Enzim protease dari *B. megaterium* TR-10 dapat diproduksi dengan sumber nitrogen susu skim dengan aktivitas protease sebesar 4,738 U/mL dan dapat dipekatkan dengan metode pengendapan aseton dari 16 mL ekstrak kasar protease menjadi 2 mL pada kadar optimum aseton sebesar 60%. Fraksi ini memperoleh nilai aktivitas spesifik sebesar 47,792 U/mg, perolehan kembali (*recovery*) sebesar 0.066%, kemurnian meningkat 1,6 kali lipat dan homogenitas protein menurun.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Banik, S., Biswas, S., dan Karmakar, S. (2018). *Extraction, Purification, and Activity of Protease from The Leaves of Moringa Oleifera*. F1000 Research. 7(1151), 3-13.
- [2] Sari, E., Logoglu, E., dan Oktemer, A. (2014). *Purification and Characterization of Organic Solvent Stable Serine Alkaline Protease from Newly Isolated Bacillus Circulans M34*. Research Article Willey Online Library.
- [3] Kompas. (2015). *Pembuatan Enzim Protease meningkat Ke Segala Industri*. <https://rumahpengetahuan.web.id/>. Diakses tanggal 13 April 2022.
- [4] Agustina, W dan Zufahair. (2006). *Pemurnian dan Karakterisasi Protease Intraseluler Dari Bakteri Pseudomonas Cocovenenans B 154*. Jurnal Sains Teknologi. 12(0):78-82.
- [5] Shindy. (2017). *Seleksi Bakteri Proteolitik Isolat TR-n dan Uji Kemampuan Protease Isolat Terpilih untuk Isolasi Kolagen dari Sisik Ikan Bandeng*. Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang.
- [6] Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., dan Shirkot, K.C. (2016). *Purification and Characterization of Detergent Stable Alkaline Protease from Bacillus Amyloliquefaciens SP1 Isolated from Apple Rhizosphere*. Journal of Basic Microbiology. 1(56):138-152.
- [7] Fitri. (2017). *Isolat TR-10: Uji Patogenesis dan Optimasi Suhu serta Waktu Inkubasi Protease dalam Mengisolasi Kolagen dari Sisik Ikan Bandeng*. Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang.
- [8] Chusniyah, N. 2013. *Isolasi Bakteri Penghasil Protease dari Terasi Sidoarjo untuk Isolasi Kolagen dari Sisik Ikan Bandeng*. Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang.