

**PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 DENGAN AMOBILISASI MENGGUNAKAN ZEOLIT**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**USWATUN HASANAH**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2016**

## ABSTRAK

### PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 DENGAN AMOBILISASI MENGUNAKAN ZEOLIT

Oleh

Uswatun Hasanah

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan stabilitas enzim protease dari isolat bakteri lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan amobilisasi menggunakan zeolit. Untuk mencapai tujuan tersebut maka dilakukan proses produksi, isolasi, pemurnian, amobilisasi enzim, dan karakterisasi enzim protease sebelum dan sesudah amobilisasi.

Aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian diperoleh sebesar 2.680,734 U/mg, meningkat 13 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim yaitu 204,465 U/mg. Enzim hasil pemurnian bekerja optimum pada suhu 50°C, sedangkan enzim amobil pada suhu 55°C. Aktivitas sisa yang dihasilkan pada uji stabilitas termal pada suhu 60°C selama 60 menit terhadap enzim hasil pemurnian adalah sebesar 2,215%, sedangkan enzim amobil sebesar 16,971%. Data kinetika enzim hasil pemurnian diperoleh data  $K_M = 21 \text{ mg substrat mL}^{-1}$ ,  $V_{maks} = 500 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 10,661 \text{ menit}$ ,  $k_i = 0,065 \text{ menit}^{-1}$  dan  $G_i = 97,667 \text{ kJ mol}^{-1}$ , sedangkan enzim amobil adalah  $K_M = 8,6 \text{ mg substrat mL}^{-1}$ ,  $V_{maks} = 200 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 26,653 \text{ menit}$ ,  $k_i = 0,026 \text{ menit}^{-1}$  dan  $G_i = 101,685 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Amobilisasi menggunakan zeolit telah berhasil meningkatkan 2,5 kali stabilitas termal enzim, yang ditunjukkan oleh penurunan nilai  $k_i$ .

**Kata kunci :** Protease, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, amobilisasi enzim, zeolit.

## ABSTRACT

### THE IMPROVEMENT OF PROTEASE ENZYME STABILITY OF *Bacillus Subtilis* ITBCCB148 WITH IMMOBILIZATION BY USING ZEOLITE

By

Uswatun Hasanah

The objective of this research was to improve protease enzyme stability from local bacteria isolates of *bacillus subtilis* ITBCCB148 with immobilization using zeolite. A sequential processes were conducted, i.e: production, isolation, purification, immobilization, and characterization of the protease before and after immobilization.

The specific activity of purified enzyme was 2,680.734 U/mg, increased 13 times higher than the raw extract (204.465 U/mg). The purified enzyme worked well at 50°C and the immobilized at 55°C. From thermal stability test at 60°C for 60 minutes, residual activity of the purified and the immobilized enzyme were 2.215% and 16.971%, respectively. Kinetic datas of the purified enzyme were  $K_M$  value = 21 mg substrat  $\text{mL}^{-1}$ ,  $V_{maks}$  = 500  $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{minute}^{-1}$ ,  $t_{1/2}$  = 10.661 minute,  $k_i$  = 0.065  $\text{minute}^{-1}$ , and  $G_i$  = 97.667  $\text{kJ mol}^{-1}$ , while the immobilized were  $K_M$  = 8.6 mg substrat  $\text{mL}^{-1}$ ,  $V_{maks}$  = 200  $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{minute}^{-1}$ ,  $t_{1/2}$  = 26.653 minute,  $k_i$  = 0.026  $\text{minute}^{-1}$  dan  $G_i$  = 101.685  $\text{kJ mol}^{-1}$ . Enzyme immobilization using zeolite has succeeded in increasing the thermal stability of the enzyme as much as 2.5 times, which is indicated be decrease in the value of  $k_i$ .

**Keywords** : Protease, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, enzyme immobilization, zeolite.

**PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 DENGAN AMOBILISASI MENGGUNAKAN ZEOLIT**

**Oleh**

**USWATUN HASANAH**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Lampung**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2016**

Judul Skripsi : **PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM PROTEASE  
DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 DENGAN  
AMOBILISASI MENGGUNAKAN ZEOLIT**

Nama Mahasiswa : **Uswatun Hasanah**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1117011050

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**MENYETUJUI**

Ketua Jurusan

**Dr. Supto Dwi Yuwono, M.T.**  
NIP 19740705 200003 1 001

Pembimbing

**Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**  
NIP 19560905 199203 1 001

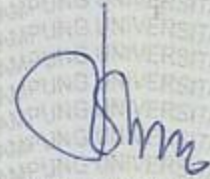


## MENGESAHKAN

### 1. Tim Penguji

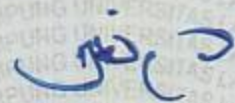
Ketua

**Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



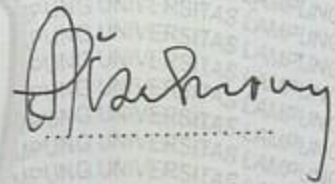
Penguji

Bukan Pembimbing : **Mulyono, Ph.D.**



Penguji

Bukan Pembimbing : **Dr. Noviany, M.Si.**

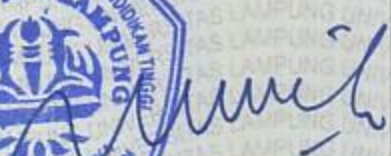


### 2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**Prof. Warsito, S.Si., DEA., Ph.D.**

NIP 19710212 199512 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 12 Oktober 2016

## RIWAYAT HIDUP



*Uswatun Hasanah* dilahirkan di Pesawaran pada tanggal 14 Juli 1993. Penulis merupakan putri kedua dari lima bersaudara, lahir dari pasangan bapak Sutrisno (Alm) dan ibu KUSDARIYAH.

Jenjang pendidikan diawali dari taman kanak-kanak di TK Islamiyah Sukoharjo II, pendidikan dasar di SD

Negeri 2 Trisnomaju diselesaikan pada tahun 2005. Pendidikan menengah pertama di SMP Tri Sukses Natar diselesaikan pada tahun 2008, dan pendidikan menengah atas di SMA Tri Sukses Natar diselesaikan pada tahun 2011. Tahun 2011, penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung (Unila) melalui jalur UM (ujian Mandiri).

Pada tahun 2015 Penulis melakukan Praktek Kerja Lapangan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unila di Bandar Lampung. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten Biokimia Jurusan Kimia, Teknik Pertanian, Teknik Hasil Pertanian, dan Biologi. Penulis juga terdaftar sebagai Kader Muda Himaki (KAMI) periode 2011-2012. Aktif sebagai anggota Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi (KPO) Himaki 2012-2013 dan anggota Biro Kesekretariatan 2013-2014. Pada tahun 2014 penulis melaksanakan Kuliah

Kerja Nyata (KKN) Tematik di Desa Rejomulyo Kecamatan Abung Timur  
Kabupaten Lampung Utara pada bulan Agustus sampai September 2014.



*Kupersembahkan karya sederhana ini kepada :*

*ALLAH S.W.T sang pemilik jiwa dan ragaku yang telah menganugerahkan hidayah-Nya, dan Nabi Muhammad SAW sebagai suri tauladanku.*

*Kedua Orang tua ku,  
Ibunda tercinta Kusdariyah dan ayahanda Sutrisno(Alm) yang telah menjadi sumber kekuatan dan semangat bagiku.*

*Sosok yang telah membesarkan ku dengan penuh cinta, kasih sayang, kesabaran, selalu memberiku semangat, dukungan, dan pelajaran berarti, dalam meraih cita, serta yang terpenting tak pernah lelah menengadahkan tangan dalam setiap sujudnya untuk mendo'akan hidupku.*

*Suamiku tercinta Mas Andi Riswanto yang senantiasa mencurahkan kasih sayang, motivasi, nasehat, dan doanya untuk kesuksesanku.*

*Keempat saudaraku:  
Kakakku terkasih Mas Kustono, S.pd dan ketiga adik-adikku tersayang Miftahul Hidayati, Intan Mila Haqiqi dan Ichsan Abidin Rosyid.*

*Pembimbing penelitian Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S.  
Pembimbing akademik Bapak Andi Setiawan, Ph.D.*

*Segenap keluarga besarku yang selalu mendo'akan keberhasilanku,*

*Guru-guru dan Dosen-dosen yang selalu membagi ilmunya untukku,*

*Seluruh sahabat dan teman-temanku yang senantiasa memberikan semangat dan bantuan untukku,*

*Serta*

*Alamamaterku tercinta.*



---

---

## *Motto*

*Sesungguhnya sesudah kesulitan  
ada kemudahan  
(Q.S Al. Insyirah;6).*

*Mengeluh tidak mengubah apapun, Bersedih tak ada gunanya.  
Tegapkan tubuhmu, kuatkan hatimu, bertindaklah.  
(Mario Teguh)*

*Berusahalah untuk tidak menjadi manusia yang berhasil tapi  
berusahalah menjadi manusia yang berguna.  
(Albert Einstein)*

*Siapaakah yang ingin menjadi insan yang kuat hendaklah dia  
bersandar kepada Allah. Karena sesungguhnya kekuatan itu  
tergantung kepada siapaakah sandarannya.  
(Salim A. Fillah)*

*Milikilah hati yang lapang, hati yang sabar lagi banyak syukur.  
Apapun yang terjadi dalam hidupmu itu atas kehendak-Nya dan  
itulah yang terbaik untukmu meskipun tidak sesuai dengan  
harapanmu, tanpa kamu ketahui banyak hikamah dibalik itu semua.  
Dan yakinlah bahwa Allah maha mengetahui.  
(Penulis)*

---

---

## SANWACANA

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah puji dan syukur penulis ucapkan kehadiran Allah S.W.T, serta sholawat dan salam selalu tercurah pada nabi Besar kita, Nabi Muhammad SAW. Atas segala rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “**PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM PROTEASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148 DENGAN AMOBILISASI MENGGUNAKAN ZEOLIT**“. Dalam menyelesaikan skripsi ini Penulis tidak luput dari bimbingan, arahan, serta bantuan dari berbagai pihak, untuk itu pada kesempatan ini Penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S., selaku Pembimbing penelitian yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, gagasan, bimbingan, bantuan, dukungan, arahan, saran dan kritik kepada Penulis dalam proses perencanaan dan pelaksanaan penelitian serta penulisan skripsi ini.
2. Bapak Mulyono, Ph.D dan Ibu Dr. Noviany, M.Si., selaku pembahas atas kesediaan memberikan arahan, koreksi, saran dan kritik sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.

3. Bapak Andi Setiawan, Ph.D., selaku Pembimbing akademik atas segala bimbingan, dukungan, motivasi, informasi, saran dan kritik yang bermanfaat kepada Penulis selama ini.
4. Bapak Prof. Warsito, S.Si., DEA., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
5. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Seluruh Staf Pengajar dan karyawan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Kedua orangtua yang sangat aku cintai, Ibunda tercinta, Kusdaryah yang selalu memberikan kasih sayang, senantiasa sabar memberikanku nasehat, tak henti memanjatkan do'a demi keberhasilan putra putrinya, memberikan motivasi dan dukungan serta senyum tulus kepada Penulis.

Ayahanda tersayang, Sutrisno(Alm) sebelum kepergiannya yang telah memberikan motivasi, semangat dan kasih sayang yang sangat luar biasa, mengajarkanku untuk menjadi orang yang kuat dan berguna bagi orang lain. Terima kasih dengan sangat tulus dan ikhlas ku ucapkan atas segala hal terbaik yang telah diberikan kepadaku, yang takkan pernah tergantikan dengan apapun.

8. Seseorang yang telah menjadi Imamku Andi Riswanto, engkau menjadi salah satu semangat dan motivatorku. Terimakasih atas kebahagiaan, dukungan, nasehat, bantuan, canda, tawa, saran dan kritik yang telah diberikan. Terimakasih sudah menjadi pendengar yang baik atas segala keluh-kesahku selama penelitian.



9. Adik-adikku tersayang Miftahul Hidayati, Intan Mila Haqiqi dan Ichsan Abidin Rosyid serta kakakku tersayang Mas Kustono, S.pd. Terima kasih atas kebahagiaan, motivasi, bantuan, keceriaan dan canda tawa yang tercipta selama ini.
10. Partner terbaikku, Ana Febrianti Wulandari dan Aprilia Isma Denila, terima kasih atas kerja sama yang sangat baik serta bantuan, dukungan, arahan, saran, canda, tawa dan motivasinya selama penelitian.
11. Yandri's Research Group Aprilia Isma Denila, Ana Febrianti Wulandari, Mbak Putri Amalia, Fifi, Putri, Satira dan Didi. Terima kasih atas kerja sama, motivasi dan keceriaannya.
12. Sahabat yang selalu tak henti menyemangatiku, memberikan saran serta membagi tawapun sedih selama ini yaitu Lusi, April, Vevi, Windi, dan Ismi
13. Teman-teman seperjuangan angkatan 2011, terima kasih atas kebersamaannya dalam menuntut ilmu menggapai impian juga canda-tawa-bahagia yang selalu kita hadirkan, anorgroup's: Yunia, Rio.W, Rina, Irkham, Dia, Melli Nop, Melly.A. Nopi dan Nico. Biokimgroup's: Aziz, Ayu, Jeje, dan Gani. Organikgroup's: Juned, Rio F, July, Mirfat, Miftah, Wagiran, Arik, Ridho, Lili, dan Andri. Fisikgroup's: Gegek, Fatma, Yudha, Tata, Yusry, Umee, Eva, Ramos, dan Ivan. Analitikgroup's: Anggino, Nira, Ayu, Mila, Fany, Daniar, Cimoy, Ari, Mega, Mardian, dan Lewi.
14. Teman-teman KKN Desa Rejomulyo Kec. Abung Timur Kab. Lampung Utara. Devi, Eti, Putri Jeni, Hani, Imam, Koni, Agus, Ivan dan Odi. Terima kasih sudah menjadi pendatang yang sangat berkesan. Semoga persaudaraan ini tetap terjaga.

15. Nenek terima kasih telah memberikan motivasi, semangat, dukungan, sumbangan pikiran, saran dan arahan kepada penulis. NENEK KU PAHLAWAN KU.
16. Puput Widya Astuti terima kasih telah membantu Penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
17. Kakak dan adik tingkat penulis: 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2012, 2013, 2014, 2015, dan 2016.
18. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung Penulis dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah mereka berikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi sedikit harapan semoga skripsi yang sederhana ini dapat berguna dan bermanfaat. Amin.

Bandar Lampung, September 2016

Penulis,

Uswatun Hasanah

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	iv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vi
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang .....	1
B. Tujuan Penelitian .....	3
C. Manfaat Penelitian .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Enzim .....	4
1. Klasifikasi enzim .....	5
2. Sifat katalitik enzim .....	6
3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim .....	6
4. Teori pembentukan enzim substrat .....	10
B. Enzim Protease .....	11
1. Protease serin .....	13
2. Protease sulfidril atau tiol .....	13
3. Protease logam .....	13
4. Protease asam .....	13
C. <i>Bacillus subtilis</i> .....	14
D. Kinetika Reaksi Enzim .....	14
E. Stabilitas Enzim .....	16
1. Stabilitas termal enzim .....	16
2. Stabilitas pH enzim .....	17
F. Isolasi dan Pemurnian Enzim .....	18
1. Sentrifugasi .....	18
2. Fraksinasi dengan ammonium sulfat .....	19
3. Dialisis .....	20
G. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry .....	21

H. Amobilisasi .....	22
I. Zeolit .....	25
<b>III. METODE PENELITIAN</b>	
A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	28
B. Alat dan Bahan .....	28
C. Prosedur Penelitian .....	29
1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi .....	29
2. Isolasi enzim protease .....	30
3. Uji aktivitas enzim protease metode <i>kunitz</i> .....	31
4. Penentuan kadar protein metode <i>Lowry</i> .....	32
5. Pemurnian enzim protease .....	33
a. Fraksinasi .....	33
b. Dialisis .....	34
6. Amobilisasi enzim protease .....	35
a. Preparasi matriks zeolit .....	35
b. Penetapan pH untuk proses pengikatan .....	35
c. Amobilisasi enzim protease .....	35
d. Pemakaian berulang enzim amobil .....	36
7. Karakterisasi enzim .....	36
a. Penentuan suhu optimum .....	36
b. Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ .....	36
c. Uji stabilitas termal enzim .....	37
8. Penentuan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ), dan perubahan energi akibat denaturasi ( $\Delta G_i$ ) .....	37
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
A. Produksi dan Isolasi Enzim Protease .....	40
B. Pemurnian Enzim Protease .....	41
1. Fraksinasi Enzim dengan Ammonium Sulfat .....	41
2. Dialisis .....	42
C. Penentuan pH pengikatan amobilisasi enzim protease .....	43
D. Karakterisasi Enzim Protease Hasil Pemurnian dan Hasil Amobilisasi .....	44
1. Penentuan suhu optimum enzim hasil pemurnian dan Hasil amobilisasi .....	44
2. Penentuan stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi .....	45

3. Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi .....	46
4. Pemakaian berulang enzim amobilisasi .....	48
E. Konstanta Laju Inaktivasi Termal ( $k_i$ ), Waktu Paruh ( $t_{1/2}$ ), dan Perubahan Energi Akibat Denaturasi ( $G_i$ ) Enzim Hasil Pemurnian dan Enzim Hasil Amobilisasi .....	49
1. Waktu paruh ( $t_{1/2}$ ) dan kontanta laju inaktivasi termal ( $k_i$ ) .....	49
2. Perubahan energi akibat denaturasi ( $G_i$ ).....	50
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN</b>	
1. Simpulan .....	52
2. Saran .....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	54
<b>LAMPIRAN</b> .....	59



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemurnian enzim protease dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148 .....	43
2. Nilai konstanta laju inaktivasi termal ( $k_i$ ), waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), dan energi akibat denaturasi ( $G_i$ ) enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi.....	49
3. Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim protease .....	59
4. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim protease .....	59
5. Hubungan antara suhu ( $^{\circ}\text{C}$ ) aktivitas enzim protease hasil pemurnian.....	60
6. Hubungan antara suhu ( $^{\circ}\text{C}$ ) aktivitas enzim protease hasil amobilisasi....	60
7. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim protease hasil pemurnian selama inaktivasi termal $60^{\circ}\text{C}$ .....	61
8. Hubungan antara aktivitas unit (U/mL) enzim protease hasil amobilisasi selama inaktivasi termal $60^{\circ}\text{C}$ .....	61
9. Data untuk penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim protease hasil pemurnian berdasarkan persamaan <i>Lineweaver – Burk</i> .....	65
10. Data untuk penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim protease hasil amobilisasi berdasarkan persamaan <i>Lineweaver – Burk</i> .....	65
11. Hubungan antara pengulangan enzim protease hasil amobilisasi dengan aktivitas unit (U/mL). .....	66
12. Data aktivitas unit penentuan pH pengikatan pada variasi pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 dan 8. ....	66
13. Absorbansi tirosin pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar tirosin. ....	67

14. Absorbansi serum albumin (BSA) pada berbagai konsentrasi untuk menentukan kurva standar protein..... 68

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu.....	7
2. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH .....	8
3. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim .....	9
4. Teori kunci gembok dan teori induksi .....	11
5. <i>Bacillus subtilis</i> .....	14
6. Kurva <i>Lineweaver-Burk</i> .....	15
7. Kerangka utama zeolit.....	27
8. Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat .....	33
9. Diagram alir penelitian .....	39
10. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-100%) dengan aktivitas spesifik enzim protease dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148.....	41
11. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-40%); (40-100%) dengan aktivitas spesifik enzim protease dari <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148 .....	42
12. Aktivitas unit enzim protease pada beberapa pH pengikatan .....	44
13. Suhu optimum enzim hasil pemurnian dan enzim hasil amobilisasi ...	45

14. Hubungan antara stabilitas termal enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi pada suhu 60°C terhadap waktu .....	46
15. Grafik <i>Lineweaver-Burk</i> enzim hasil pemurnian dan amobilisasi .....	47
16. Pemakaian berulang enzim hasil amobilisasi.....	48
17. Grafik $\ln(E_i/E_0)$ enzim protease hasil pemurnian dan amobilisasi .....	62
18. Kura standar tirosin .....	67
19. Kurva standar serum albumin .....	68

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Protease merupakan salah satu enzim yang paling banyak diaplikasikan dalam bidang industri, 65% total penjualan enzim di dunia merupakan enzim protease (Huang *et al.*, 2006). Pada beberapa industri enzim ini digunakan dalam bidang farmasi, pembuatan deterjen, produk-produk kulit, pengempukan daging, hidrolisa protein, produk-produk makanan dan proses pengolahan limbah industri (Martin *and* Nascimento, 2006). Penggunaan enzim sebagai biokatalisator industri dikarenakan sifat enzim yang dapat meningkatkan produk beribu kali lebih tinggi karena tidak ada reaksi samping, bekerja pada pH yang relatif netral dengan suhu yang relatif rendah, serta bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu (Boyer *and* Carlton, 1971).

Protease mampu mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein karena enzim ini termasuk ke dalam enzim proteolitik. Salah satu mikroba yang menghasilkan enzim protease adalah *Bacillus subtilis*. Pada mikroba ini enzim protease dihasilkan secara ekstraselular sehingga pemurnian enzim dapat dilakukan dengan cara pemisahan dan pemurnian yang sederhana dibandingkan dengan enzim protease yang dihasilkan secara intraseluler (Smith, 1990).



Penggunaan enzim dalam proses industri harus memenuhi syarat-syarat tertentu yaitu enzim harus stabil pada suhu tinggi yaitu di atas kondisi fisiologis dengan suhu  $>50^{\circ}\text{C}$  (Gaman dan Sherrington, 1994) dan tahan terhadap keadaan pH ekstrim ( $< \text{pH } 4,5$  dan  $> \text{pH } 8$ ) (Williamson *and* Fieser, 1992). Sedangkan, pada umumnya enzim hanya mampu bekerja pada kondisi fisiologis dan tidak tahan terhadap kondisi ekstrim (Goddatte, 1993). Untuk mendapatkan enzim yang stabil dapat dilakukan dengan cara mengisolasi enzim dari mikroba yang hidup pada kondisi ekstrimofilik (Wagen, 1984) atau dengan melakukan amobilisasi, mutagenesis dan modifikasi kimia (Mozhaev *and* Martinek, 1984). Amobilisasi enzim adalah suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak (Winarno, 1986), penggunaan enzim amobil dalam industri memiliki beberapa kelebihan yaitu dapat digunakan berulang, dapat mengurangi biaya, produk tidak dipengaruhi oleh enzim, memudahkan pengendalian enzim, tahan pada kondisi ekstrim, dapat digunakan untuk uji analisis, meningkatkan daya guna, dan memungkinkan proses sinambung (Payne *et al*, 1992; Wang *et al*, 1979).

Pemanfaatan zeolit alam sebagai media pendukung amobilisasi sebelumnya telah dilakukan yaitu untuk amobilisasi enzim  $\alpha$ -amilase (Septiani dan Lisma, 2011) terbukti dapat meningkatkan stabilitas enzim, enzim  $\alpha$ -amilase sebelum diamobil kondisi optimumnya pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , pH 5,6 dan waktu inkubasi 35 menit dengan aktivitas unit sebesar 0,04845 U/mL. Sedangkan untuk enzim  $\alpha$ -amilase setelah diamobil kondisi optimumnya pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ , pH 5,6 dan waktu inkubasi 45 menit dengan aktivitas unit sebesar 0,030036 U/mL dan enzim hasil amobilisasi dapat digunakan sebanyak 3 kali pengulangan. Pada penelitian ini dilakukan

amobilisasi enzim protease yang diisolasi dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 menggunakan zeolit alam sebagai media pendukung. Amobilisasi diharapkan dapat meningkatkan stabilitas enzim. Menggunakan zeolit untuk mengikat enzim karena enzim mempunyai pori-pori atau situs aktif yang memiliki kemampuan dalam mengadsorpsi (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

### **B. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Memperoleh enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan aktivitas dan tingkat kemurnian yang tinggi.
2. Memperoleh enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan kestabilan yang tinggi melalui amobilisasi dengan zeolit.

### **C. Manfaat Penelitian**

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi cara isolasi dan pemurnian enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.
2. Memberikan informasi tentang cara meningkatkan stabilitas enzim protease dengan amobilisasi.
3. Memberikan informasi tentang pengaruh zeolit terhadap stabilitas enzim protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148.
4. Enzim protease dengan stabilitas yang tinggi dapat digunakan dalam proses-proses industri.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Enzim

Enzim adalah biomolekul berupa protein berbentuk bulat (globular), yang terdiri atas satu rantai polipeptida atau lebih dari satu rantai polipeptida (Wirahadikusumah, 1989). Enzim berfungsi sebagai katalis atau senyawa yang dapat mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi. Dengan adanya enzim, molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk (Smith, 1997; Grisham *and* Reginald, 1999).

Keunggulan enzim sebagai biokatalisator antara lain memiliki spesifitas tinggi, mempercepat reaksi kimia tanpa pembentukan produk samping, produktivitas tinggi dan dapat menghasilkan produk akhir yang tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan efek kerusakan lingkungan (Chaplin *and* Bucke, 1990). Suatu enzim dapat mempercepat laju reaksi kira-kira  $10^8$  sampai  $10^{11}$  kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis (Poedjiadi, 1994).

Enzim bekerja sangat spesifik dalam kerja katalitiknya, sehingga enzim dikatakan mempunyai sifat sangat khas karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu (Girindra, 1986). Kespesifikan ini disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus-gugus polar atau non-polar dalam struktur

enzim (Fessenden dan Fessenden 1992). Salah satu fungsi yang paling menonjol dari protein adalah aktivitas enzim. Enzim mempunyai fungsi khusus antara lain yaitu : (1) menurunkan energi aktivasi, (2) mempercepat reaksi pada suhu dan tekanan tetap tanpa mengubah besarnya tetapan seimbangannya, dan (3) mengendalikan reaksi (Page, 1997).

Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah enzim bersifat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, aman, mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, serta dapat didegradasi secara biologis (Page, 1997). Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi dan industri kimia lainnya. Dalam bidang pangan misalnya amilase, glukosa-isomerase, papain dan bromelin. Sedangkan dalam bidang kesehatan contohnya amilase, lipase dan protease. Dalam banyak aplikasi bioteknologi, selulase digunakan dalam proses sakarifikasi bahan berselulosa, deterjen, industri makanan, dan pengolahan limbah pabrik kertas (Busto *et al*, 1995; Akiba *et al.*, 1995). Enzim dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Crueger *et al*, 1982). Namun, secara umum enzim diisolasi dari mikroorganisme karena pertumbuhan mikroorganisme relatif lebih cepat sehingga enzim yang dihasilkan lebih banyak.

### **1. Klasifikasi enzim**

Menurut Wirahadikusumah (2001) enzim dapat diklasifikasi menjadi enam golongan utama berdasarkan macam reaksi yang dikatalisisnya dan tiap golongan utama terbagi lagi menjadi kelompok-kelompok enzim berdasarkan gugus substrat yang diserangnya:

- 1) Oksido-reduktase: berperan dalam reaksi oksidasi-reduksi.
- 2) Transferase: berperan dalam reaksi pemindahan gugus tertentu.
- 3) Hidrolase: berperan dalam reaksi hidrolisis.
- 4) Liase: mengkatalisis reaksi adisi atau pemecahan ikatan rangkap dua.
- 5) Isomerase: mengkatalisis reaksi isomerisasi.
- 6) Ligase: mengkatalisis reaksi pembentukan ikatan dengan bantuan pemecahan ikatan dalam ATP.

## **2. Sifat katalitik enzim**

Menurut Page (1989) sifat-sifat katalitik dari enzim ialah sebagai berikut:

- a. Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologik) dari tekanan, suhu dan pH.
- b. Enzim mempunyai selektifitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis.
- c. Enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa.

## **3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim**

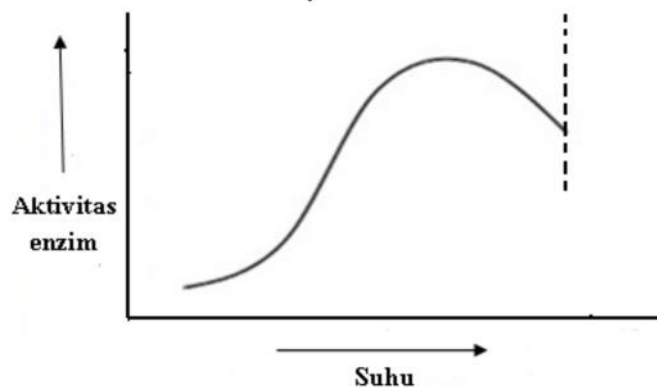
Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah sebagai berikut:

### **a. Suhu**

Enzim dapat mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan meningkat seiring dengan naiknya suhu. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 1987). Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi



(Poedjiadi, 1994). Pada suhu  $0^{\circ}\text{C}$ , enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay dan Sugyo, 1992). Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 1.

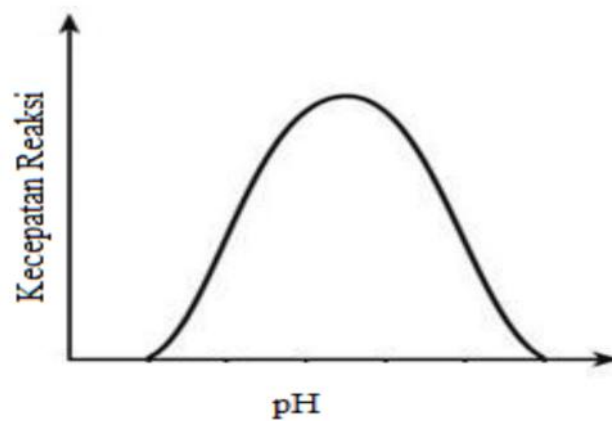


**Gambar 1.** Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Rodwell, 1987).

Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh suhu. Suhu optimal enzim antara  $35^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$ , yaitu suhu tubuh. Pada suhu di atas dan di bawah optimalnya, aktivitas enzim berkurang. Di atas suhu  $50^{\circ}\text{C}$  enzim secara bertahap menjadi inaktif karena protein terdenaturasi. Pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  semua enzim rusak. Pada suhu yang sangat rendah, enzim tidak benar-benar rusak tetapi aktivitasnya sangat banyak berkurang (Gaman dan Sherrington, 1994).

#### **b. pH**

Enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama gugus terminal karboksil dan gugus terminal amino. Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 1989). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH ditunjukkan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Winarno, 1989).

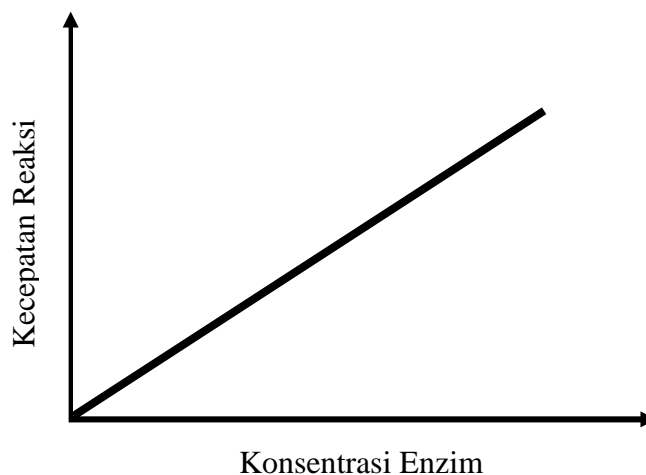
pH optimal enzim adalah sekitar pH 7 (netral) dan jika medium menjadi sangat asam atau sangat alkalis enzim mengalami inaktivasi. Akan tetapi beberapa enzim hanya beroperasi dalam keadaan asam atau alkalis. Sebagai contoh, pepsin, enzim yang dikeluarkan ke lambung, hanya dapat berfungsi dalam kondisi asam, dengan pH optimal 2 (Gaman dan Sherrington, 1994).

Enzim memiliki kontanta disosiasi pada gugus asam ataupun gugus basa terutama pada residu terminal karboksil dan asam aminonya. Namun dalam suatu reaksi kimia, pH untuk suatu enzim tidak boleh terlalu asam maupun terlalu basa karena akan menurunkan kecepatan reaksi dengan terjadinya denaturasi. Enzim memiliki pH optimum tertentu, pada umumnya sekitar pH 4,5 sampai 8, dan pada kisaran pH tersebut enzim mempunyai kestabilan yang tinggi (Williamson *and* Fieser, 1992).

### **c. Konsentrasi enzim**

Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi akan meningkat hingga batas konsentrasi tertentu. Namun, hasil hidrolisis substrat akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim. Hal ini disebabkan penambahan enzim sudah tidak

efektif lagi (Reed, 1975). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 3.



**Gambar 3.** Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Reed, 1975).

#### **d. Konsentrasi substrat**

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi (Lehninger, 1982).

#### **e. Aktivator dan inhibitor**

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 2006).

Menurut Wirahadikusumah (1989), inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim. Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1989).

#### **4. Teori pembentukan enzim substrat**

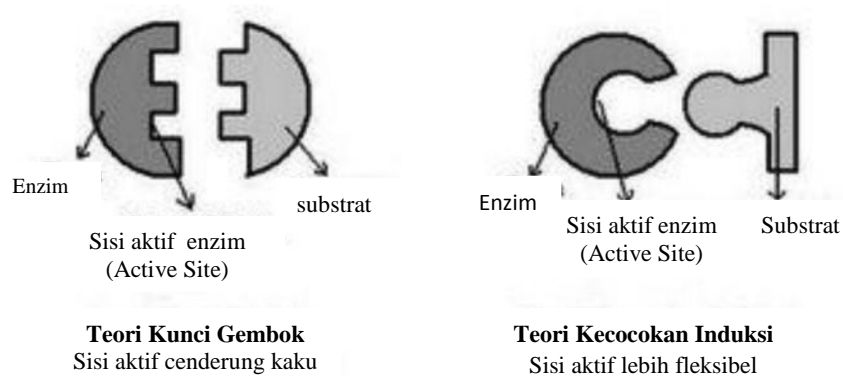
Menurut Shahib (2005) ada dua teori pembentukan kompleks enzim substrat yaitu teori *lock and key* dan teori *induced-fit* yang dapat diilustrasikan pada Gambar 4.

##### **a. Teori *lock and key* (gembok dan kunci)**

Di mana substrat yang spesifik akan terikat pada daerah spesifik di molekul enzim yang disebut sisi aktif. Substrat mempunyai daerah polar dan non polar pada sisi aktif yang baik bentuk maupun muatannya merupakan pasangan substrat. Hal ini terjadi karena adanya rantai peptida yang mengandung rantai residu yang menuntun substrat untuk berinteraksi dengan residu katalitik. Ketika katalisis berlangsung, produk masih terikat pada molekul enzim. Kemudian produk akan bebas dari sisi aktif dengan terbebasnya enzim.

##### **b. Teori *induced-fit* (ketepatan induksi)**

Teori ini menerangkan bahwa enzim bersifat fleksibel. Dimana sebelumnya bentuk sisi aktif tidak sesuai dengan bentuk substrat, tetapi setelah substrat menempel pada sisi aktif, maka enzim akan terinduksi dan menyesuaikan dengan bentuk substrat.



**Gambar 4.** Teori kunci gembok dan teori induksi (Shahib, 2005).

## B. Enzim Protease

Protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan molekul protein menjadi oligopeptida dan asam amino (Poedjiadi, 2006). Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme karena memiliki beberapa keunggulan. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Mikroba yang telah dikembangkan secara komersial sebagai penghasil protease antara lain *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger*. Industri pengguna protease diantaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, hidrolisat protein, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, film dan limbah.

Enzim ini akan mengkatalis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan unsur air pada ikatan spesifik substrat. Karena itu, enzim ini termasuk dalam kelas utama enzim golongan hidrolase. Berdasarkan cara kerjanya, enzim protease dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu endopeptidase (memecah ikatan peptida dari

arah dalam) dan eksopeptidase (memecah protein dan ikatan peptida dari arah luar, arah gugus karboksil terminal atau gugus amino terminal) (Winarno,1986).

Kebanyakan protease stabil pada suhu normal (mesofilik), namun enzim mesofilik sering tidak secara optimal beradaptasi dengan kondisi-kondisi dimana enzim diharapkan dapat diterapkan. Beberapa strategi digunakan untuk meningkatkan karakteristik biokatalisator seperti stabilitas, aktivitas, spesifitas, dan pH optimum. Isolasi enzim dari organisme yang mampu bertahan di bawah kondisi-kondisi ekstrim, dapat menjadi sumber penting untuk biokatalis baru.

Akhir-akhir ini protease dari mikroorganisme termofilik menjadi pusat perhatian terutama enzim-enzimnya. Mikroorganisme ini beradaptasi untuk tumbuh dalam cakupan luas pada suhu, pH, dan tekanan selama evolusinya. Jenis yang ditemukan di atas suhu yang lebih tinggi (105-113°C) hanya dari Archaea (Setter, 1996).

Protease bakteri termofilik menjadi pusat perhatian karena stabilitasnya pada suhu yang lebih tinggi. Enzim termofilik secara optimal aktif lebih jauh di bawah kondisi terdenaturasi. Hasil elusidasi struktur dari kristal enzim ini menunjukkan strukturnya lebih kaku dari enzim mesofil karena struktur bagian dalam dari enzim termofilik mempunyai jaringan pasangan ion yang sangat luas dibanding enzim mesofil (Yuwono, 2005).

Mikroba endoprotease secara umum diklasifikasikan ke dalam 4 golongan berdasarkan residu asam amino yang berada pada sisi aktifnya (Witazora, 2008), yaitu :

### 1. Protease serin

Protease yang memiliki residu serin pada sisi aktifnya dan dapat dihambat oleh hidroksil-organofluorida reaktif, seperti diisopropilfluorofosfat dan fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF). Semua enzim tersebut bersifat endopeptidase. Enzim yang termasuk golongan ini adalah tripsin, kimotripsin, elastase dan subtilin.

### 2. Protease sulfidril atau tiol

Protease yang mempunyai sulfidril pada sisi aktifnya yang distimulasi dengan agen pereduksi seperti ditionitritol dan sistein serta dapat dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat. Enzim yang termasuk golongan ini adalah protease dari tanaman (bromelin, papain, fisin) dan protease mikroba. Aktivitas enzim ini optimal pada pH netral.

### 3. Protease logam

Protease yang keaktifannya bergantung pada adanya ion logam (protease netral dan protease alkali) sebagai aditif umumnya ditambahkan garam  $\text{Ca}^{2+}$  dalam bentuk garam klorida (Schwimmer, 1981). Kation-kation yang dapat mengaktifkan enzim adalah  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  dan  $\text{Al}^{3+}$ . Keaktifannya dapat dihambat oleh EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*).

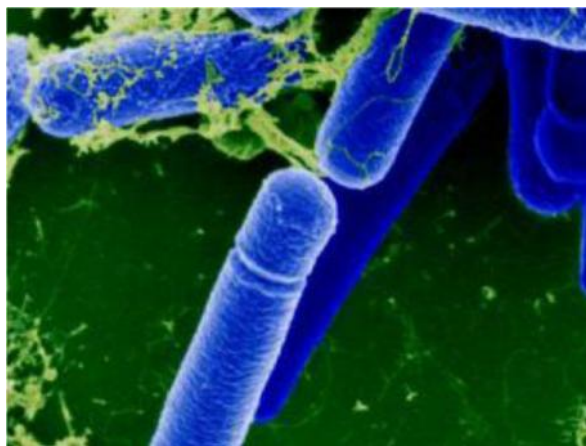
### 4. Protease asam

Protease yang mempunyai dua gugus karboksil pada sisi aktifnya dan memiliki residu aspartat atau glutamat pada titik isoelektrik sekitar pH 3,5 yang dapat dihambat oleh p-bromofenasilbromida. Enzim yang termasuk golongan ini adalah pepsin, renin dan protease kapang.

### C. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* adalah salah satu jenis bakteri yang umum ditemukan di tanah. *Bacillus subtilis* mempunyai kemampuan untuk membentuk endospora yang protektif yang memberi kemampuan bakteri tersebut mentolerir keadaan yang ekstrim. Sporangya berbentuk oval atau silinder dan lebarnya tidak melebihi dari sel induknya (Schelege and Schmidt, 1994). *Bacillus subtilis* berbentuk batang lurus gram positif berukuran 1,5 x 4,5  $\mu\text{m}$ , sendiri-sendiri atau tersusun dalam bentuk rantai (Gupta, 1990).

*Bacillus subtilis* diklasifikasikan sebagai bakteri yang bersifat aerob. *Bacillus subtilis* merupakan jenis kelompok bakteri yang mampu mensekresikan antibiotik dalam jumlah besar ke luar dari sel (Sastrodinoto, 1980). Gambar *Bacillus subtilis* ditunjukkan pada Gambar 5.

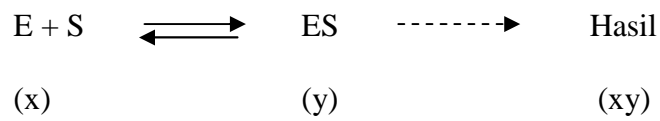


**Gambar 5.** *Bacillus subtilis* (Gupta, 1990).

### D. Kinetika Reaksi Enzim

Dalam tahun 1913 Michaelis-Menten menunjuk pada mekanisme berikut untuk menjelaskan kekuatan reaksi-reaksi enzim.





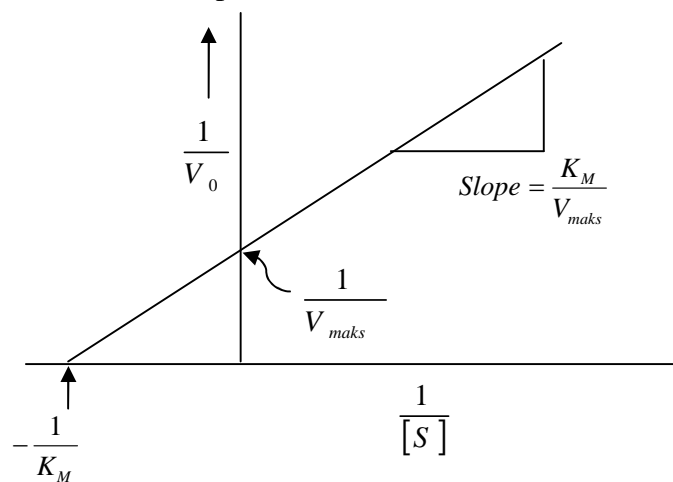
Dimana E = enzim, ES = kompleks enzim substrat, dan S = substrat, sedangkan  $[S] \gg [E]$  dan  $[ES]$ . Transformasi persamaan Michaelis-Menten yang paling banyak digunakan adalah “*double reciprocal*” Lineweaver-Burk, dengan menggabung persamaan Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{K_M + [S]} \longrightarrow \boxed{\text{Persamaan Michaelis-Menten}}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\text{maks}} [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\text{maks}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{maks}}} \longrightarrow \boxed{\text{Persamaan Lineweaver-Burk}}$$

Plot dari pasangan data  $(1/[S]_{0i}, 1/v_{0i})$ , untuk  $i = 1, \dots, n$ , dengan  $n$  adalah jumlah pasangan data, akan memberikan suatu garis lurus dengan ordinat dan absis intercept  $1/V_{\text{maks}}$  dan  $-1/K_M$  pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Kurva *Lineweaver-Burk* (Suhartono, 1989).

## **E. Stabilitas Enzim**

Stabilitas enzim dapat diartikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam atau basa), oleh pengaruh suhu kondisi-kondisi non fisiologis lainnya (Kazan *et al.*, 1997). Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim sebagai biokatalis. Banyak faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim, seperti pH, suhu, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005).

Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami tidak atau kurang stabil (Junita, 2002). Menurut Illanes (1999), untuk meningkatkan stabilitas enzim dapat dilakukan dengan penggunaan zat aditif, modifikasi kimia, amobilisasi dan rekayasa protein.

### **1. Stabilitas termal enzim**

Pada suhu yang terlalu rendah kemantapan enzim tinggi, tetapi aktivitasnya rendah. Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitas enzim tinggi, tetapi kemantapannya rendah. Daerah suhu saat kemantapan dan aktivitas enzim cukup besar disebut suhu optimum (Wirahadikusumah, 2001).

Dalam industri, pada proses reaksinya menggunakan suhu tinggi bertujuan untuk mengurangi tingkat kontaminasi dan masalah viskositas serta meningkatkan laju

reaksi. Namun, suhu tinggi merupakan masalah utama dalam stabilitas enzim, karena enzim umumnya tidak stabil pada suhu tinggi.

Proses inaktivasi enzim pada suhu tinggi berlangsung dalam dua tahap, yaitu :

- a. Adanya pembukaan partial (partial *unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuartener molekul enzim.
- b. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino-asam amino tertentu oleh panas (Ahern *and* Klibanov, 1987).

Air memegang peranan penting pada kedua tahap di atas. Oleh karena itu, dengan menggunakan air seperti pada kondisi mikroakueus, reaksi inaktivasi oleh panas dapat diperlambat dan stabilitas termal enzim akan meningkat.

Stabilitas termal enzim akan jauh lebih tinggi dalam kondisi kering dibandingkan dalam kondisi basah. Adanya air sebagai pelumas membuat konformasi suatu molekul enzim menjadi sangat fleksibel, sehingga bila air dihilangkan molekul enzim akan menjadi lebih kaku (Virdianingsih, 2002).

## **2. Stabilitas pH enzim**

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi (Suhartono, 1989). Stabilitas enzim dipengaruhi oleh banyak faktor seperti suhu, pH, pelarut, kofaktor dan kehadiran surfaktan (Eijsink *et al.*, 2005). Dari faktor-faktor tersebut, pH memegang peranan penting. Diperkirakan perubahan keaktifan pH lingkungan disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH optimum enzim dengan stabilitas yang tinggi (Winarno, 1986).

Pada reaksi enzimatik, sebagian besar enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya secara cepat dan *irreversibel* pada pH yang jauh dari rentang pH optimum untuk reaksi enzimatik. Inaktivasi ini terjadi karena *unfolding* molekul protein sebagai hasil dari perubahan kesetimbangan elektrostatis dan ikatan hidrogen (Kazan *et al.*, 1997).

## **F. Isolasi dan Pemurnian Enzim**

Enzim dapat diisolasi secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang bekerja di luar sel, sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang bekerja di dalam sel. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih mudah dibandingkan ekstraksi enzim intraseluler, karena tidak memerlukan pemecahan sel dan enzim yang dikeluarkan dari sel mudah dipisahkan dari pengotor lain serta tidak banyak bercampur dengan bahan-bahan sel lain (Pelczar *and* Chan, 1986 ).

### **1. Sentrifugasi**

Sentrifugasi merupakan tahap awal pemurnian enzim. Metode ini digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat pada dasar tabung, yang kemudian dipisahkan secara normal. Sel-sel mikroba biasanya mengalami sedimentasi pada kecepatan 5000 selama 15 menit (Scopes, 1982; Walsh *and* Headon, 1994).

Menurut Cooper (1994), prinsip sentrifugasi berdasarkan pada kenyataan bahwa setiap partikel yang berputar pada laju sudut yang konstan akan memperoleh gaya

keluar (F). Besar gaya ini bergantung pada laju sudut (radian/detik) dan radius pertukarannya (sentimeter) (Sariningsih, 2000).

## **2. Fraksinasi dengan ammonium sulfat**

Presipitasi adalah proses penambahan senyawa yang dapat menggumpalkan dan memisahkan protein dari bahan lain sehingga didapatkan protein yang lebih murni (Suhartono *et al.*, 1992). Menurut Chaplin dan Bucke (1990), presipitasi protein merupakan metode yang berguna untuk pemekatan protein dan sering dilakukan pada tahap awal dari pemurnian enzim. Presipitasi protein dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain perubahan pH, penambahan pelarut organik dan penambahan garam.

Pemekatan protein dengan penambahan garam ke dalam larutan enzim merupakan cara yang banyak dilakukan. Garam yang dapat digunakan berupa natrium klorida, natrium sulfat, atau ammonium sulfat. Ammonium sulfat lebih sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan garam-garam yang lain, yaitu mempunyai kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendapan yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya murah (Scopes, 1982).

Penambahan garam pada konsentrasi tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik molekul-molekul air dari protein. Interaksi hidrofobik sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menyebabkan pengendapan protein, yang disebut *salting out*. Protein yang hidrofobitasnya tinggi akan

mengendap lebih dahulu, sedangkan protein yang memiliki sedikit residu non polar akan tetap larut meskipun pada konsentrasi garam yang paling tinggi (Scopes, 1982; Walsh *and* Headon, 1994).

### **3. Dialisis**

Salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan kemurnian enzim adalah dialisis. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul besar dari molekul-molekul kecil dengan bantuan membran *semipermeable*. Dialisis berfungsi untuk memisahkan garam-garam anorganik agar tidak mengganggu tahap pemurnian enzim selanjutnya. Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan kantong selofan, kantong ini memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari kantong selofan. Penggunaan kantong selofan memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah digunakan, memiliki harga yang relatif murah dan mudah didapatkan (Kristanti, 2001).

Proses dialisis berlangsung karena adanya perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam dan di luar membran. Difusi zat terlarut bergantung pada suhu dan viskositas larutan. Meskipun suhu tinggi dapat meningkatkan laju difusi, namun sebagian besar protein dan enzim stabil pada suhu 4-8°C sehingga dialisis harus dilakukan di dalam ruang dingin (Pohl, 1990).

Pada proses dialisis, larutan enzim dimasukkan ke dalam kantong dialisis yang terbuat dari membran *semipermeable* (selofan). Jika kantong yang berisi larutan enzim dimasukkan ke dalam larutan buffer, maka molekul protein kecil yang ada di dalam larutan protein atau enzim seperti garam anorganik akan keluar melewati

pori-pori membran, sedangkan molekul enzim yang berukuran besar tetap tertahan dalam kantung dialisis. Keluarnya molekul menyebabkan distribusi ion-ion yang ada di dalam dan di luar kantung dialisis tidak seimbang. Untuk memperkecil pengaruh ini digunakan larutan buffer dengan konsentrasi rendah di luar kantung dialisis (Lehninger, 1982). Setelah tercapai keseimbangan, larutan diluar kantung dialisis dapat dikurangi. Proses ini dapat dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantung dialisis dapat diabaikan (Boyer, 1993).

### **G. Penentuan kadar protein dengan metode Lowry**

Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada setiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang baik. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) yang akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocelteau* ditambahkan, maka reagen akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin* menjadi heteromolibdenum dan mengubah warna kuning menjadi biru.

Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks  $\text{Cu}^{2+}$  dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi  $\text{Cu}^+$  pada kondisi basa.  $\text{Cu}^+$  dan rantai samping tirosin, triptofan dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocelteau*. Reagen ini bereaksi menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molibdenum atau *tungsteen blue*. Protein akan

menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya.

Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, metode ini mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasinya adalah dengan menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

#### **H. Amobilisasi Enzim**

Amobilisasi enzim adalah suatu enzim yang secara fisik maupun kimia tidak bebas bergerak, sehingga dapat dilakukan atau diatur kapan enzim harus bereaksi dengan substrat (Winarno, 1986). Keunggulan penggunaan enzim amobil dalam industri menurut Payne *et al.* (1992) dan Wang *et al.* (1979) antara lain:

- 1) Dapat digunakan berulang
- 2) Dapat mengurangi biaya
- 3) Produk tidak dipengaruhi oleh enzim
- 4) Memudahkan pengendalian enzim
- 5) Tahan kondisi ekstrim
- 6) Dapat digunakan untuk uji analisis
- 7) Meningkatkan daya guna
- 8) Memungkinkan proses sinambung

Metode amobilisasi fisik (penjebakan) adalah metode adsorpsi dengan menggunakan permukaan padat atau menempelkan enzim pada permukaan adsorben (Suklha *et al.*, 2003). Metode amobilisasi secara fisik (penjebakan)



memiliki kelebihan yaitu aktivitas dari enzim tetap tinggi (tidak terjadi perubahan konformasi enzim) dan media dapat diregenerasi (Susanto, 2003).

Menurut Chibata (1978), metode untuk amobilisasi enzim dapat dikelompokkan dalam tiga kategori, yaitu:

### **1. Metode penjebakan**

Teknik penjebakan enzim berdasarkan pada penempatan enzim dalam kisi-kisi matriks polimer atau membran. Penjebakan enzim dapat dilakukan dalam gel atau serat polimer. Matriks gel yang dapat digunakan antara lain, adalah poliakrilamida, K-karagen, dan pati.

Sedangkan serat yang dipakai antara lain, adalah selulosa asetat. Cara penjebakan memberi keuntungan karena secara relatif struktur alami enzim tidak mengalami gangguan fisik. Hal itu disebabkan oleh enzim yang tidak berikatan dengan bahan pendukung, sehingga tidak terjadi perubahan konformasi enzim atau inaktivasi enzim. Akan tetapi untuk membentuk kompleks antara enzim dengan substrat sangat kecil kemungkinannya, karena enzim tidak berada pada permukaan bahan pendukung.

Teknik penjebakan enzim dalam mikro kapsul yang berupa membran polimer semipermeabel mempunyai keuntungan, yaitu daerah permukaan reaksi antara substrat cukup luas. Tetapi kerugian dalam pemakaian cara ini, adalah : (1) terjadinya inaktivasi enzim selama pembentukan mikro kapsul, (2) dibutuhkan konsentrasi enzim yang besar, (3) adanya kemungkinan enzim bergabung dengan dinding membran.

## **2. Metode pengikatan (adsorpsi) pada bahan pendukung**

Amobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi dapat dilakukan dengan bahan pendukung seperti bentonit, silika gel, zeolit, dan alumina. Ikatan kimia yang dapat terbentuk adalah ikatan hidrogen ikatan hidrofobik, dan gaya van der waals yang bersifat lemah sehingga kemungkinan untuk merubahnya konformasi enzim secara fisik dapat diabaikan. Disamping itu cara ini mempunyai keuntungan yaitu, dapat membentuk enzim amobil yang lebih banyak dari pada hasil amobilisasi dengan cara lain, karena pada cara ini enzim akan berada langsung pada permukaan bahan pendukung yang kemungkinan bertemunya enzim dengan substrat lebih besar dan akan terbentuk kompleks enzim substrat yang lebih banyak pula.

## **3. Metode ikatan silang**

Amobilisasi enzim dengan cara ikatan silang dapat terbentuk antara molekul enzim yang berikatan kovalen satu sama lain oleh zat berikatan silang seperti glutaraldehida, yang membentuk struktur tiga dimensi yang tidak larut dalam air. Reagen pengikat silang harus memiliki dua atau lebih gugus fungsi. Reagen pembentuk ikatan silang yang sering digunakan adalah glutaraldehida, turunan isosianat, bisdiazobenzidina, N,N-etilen bismaleimida, dan N,N-polimetilen bisoodoaseomida. Kerugian dalam pemakaian cara ini adalah dapat terjadinya inaktivasi enzim akibat pembentukkan ikatan antara pusat aktif enzim dengan zat pengikat silang (Wiseman, 1985).

## I. Zeolit

Mineral zeolit banyak ditemukan di alam sebagai batuan sedimen vulkano. Penyusunan utama zeolit adalah mordenit dan klipnotilonit dalam berbagai variasi komposisi. Nama zeolit berasal dari dua kata dalam bahasa Yunani yaitu zein yang berarti mendidih dan lithos yang berarti batuan. Disebut demikian karena mineral ini mempunyai sifat mendidih atau mengembang apabila dipanaskan. Dimana air dalam rongga-rongga zeolit akan mendidih bila dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

Zeolit menurut proses pembentukannya dibagi 2, yaitu : zeolit alam (*natural zeolit*) dan zeolit sintetis (*synthetic zeolit*). Zeolit alam biasanya mengandung kation-kation  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  atau  $\text{Mg}^{2+}$  sedangkan zeolit sintetis biasanya hanya mengandung kation-kation  $\text{K}^+$  atau  $\text{Na}^+$ . Pada zeolit alam, adanya molekul air dalam pori dan oksida bebas di permukaan seperti  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$  dapat menutupi pori-pori atau situs aktif dari zeolit sehingga dapat menurunkan kapasitas adsorpsi maupun sifat katalisis dari zeolit tersebut. Inilah alasan mengapa zeolit alam perlu diaktivasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Aktivasi zeolit alam dapat dilakukan secara fisika maupun kimia. Secara fisika, aktivasi dapat dilakukan dengan pemanasan pada suhu  $300\text{-}400^{\circ}\text{C}$  dengan udara panas atau dengan sistem vakum untuk melepaskan molekul air. Sedangkan aktivasi secara kimia dilakukan melalui pencucian zeolit dengan larutan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  atau asam-asam anorganik seperti  $\text{HF}$ ,  $\text{HCl}$  dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  untuk menghilangkan oksida-oksida pengotor yang menutupi permukaan pori (Sutarti dan Rachmawati, 1994).

Zeolit didefinisikan sebagai senyawa aluminosilikat yang mempunyai struktur kerangka tiga dimensi dengan rongga didalamnya. Struktur kerangka zeolit tersusun atas unit-unit tetrahedral  $(\text{AlO}_4)^{-5}$  dan  $(\text{SiO}_4)^{-4}$  yang saling berikatan melalui atom oksigen membentuk pori-pori zeolit. Ion silikon bervalensi 4, sedangkan aluminium bervalensi 3. Hal ini yang menyebabkan struktur zeolit kelebihan muatan negatif yang diseimbangkan oleh kation-kation logam alkali atau alkali tanah seperti  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  atau  $\text{Sr}^+$  maupun kation-kation lainnya. Kation-kation tersebut terletak diluar tetrahedral, dapat bergerak bebas dalam rongga-rongga zeolit dan bertindak sebagai *counter* ion yang dapat dipertukarkan dengan kation-kation lainnya, sifat-sifat inilah yang mendasari zeolit sebagai penukar kation. Berdasarkan sifat fisika dan sifat kimia zeolit tersebut zeolit dapat dimanfaatkan sebagai penukar ion, penyaring molekuler, adsorben dan katalis (Senda, 2005).

Rumus umum zeolit adalah  $\text{M}_{x/n}[(\text{AlO}_2)_x(\text{SiO}_2)_y] \cdot m\text{H}_2\text{O}$

$\text{M}_{x/n}$  = kation bermuatan

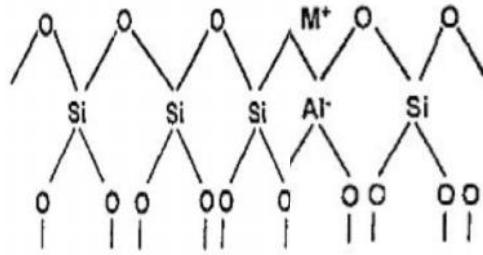
[ ] = kerangka aluminosilika

X = jumlah  $\text{AlO}_4$

Y = jumlah  $\text{SiO}_4$ ,  $y > x$

Z = jumlah  $\text{H}_2\text{O}$

Kerangka zeolit berupa rongga yang berisi kation  $\text{M}^+$  sebagai kation penyumbang muatan  $\text{AlO}_4$  yang ditunjukkan pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Kerangka utama zeolit (Lisley and Elain, 1992)

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari - Mei 2016 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas, kapas, kain kasa, karet gelang, alumunium foil, kertas, jarum ose, pembakar spiritus, autoklaf model S-90N, *laminar air flow* CURMA model 9005-FL, neraca analitik, *shaker incubator*, *magnetic stirrer*, sentrifuga, lemari pendingin, mikropipet *Eppendroff*, *waterbath*, termometer, spatula dan spektrofotometer UV-Vis Carry Win UV 32.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah NA (*Nutrient Agar*), pepton,  $MgSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , *yeast extract*, glukosa, NaCl, *buffer* posfat, kasein, TCA (*Tri Chloroacetic Acid*), tirosin, NaOH,  $Na_2CO_3$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1%, Na/K tartarat 1%, reagen *follin-ciocalteau*, pereaksi DNS (*dinitrosalisilic acid*), *Bovine Serum Albumin* (BSA), akuades, alkohol, kantong selofan dan zeolit. Mikroorganisme

yang digunakan adalah bakteri *Bacillus subtilis* ITBCCB148 penghasil enzim protease yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung.

### **C. Prosedur Penelitian**

#### **1. Pembuatan media inokulum dan fermentasi, inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dan produksi enzim protease**

##### **a. Pembuatan media inokulum dan fermentasi**

Media inokulum digunakan sebagai medium adaptasi awal pertumbuhan dan medium perkembangbiakan bakteri pada media cair tanpa terjadinya produksi enzim protease. Sedangkan media fermentasi digunakan sebagai medium pertumbuhan dan perkembangbiakan disertai produksi enzim protease. Media inokulum yang digunakan terdiri dari  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 gram, NaCl 0,25 gram,  $\text{MgSO}_4$  0,005 gram, pepton 0,5 gram, *yeast extract* 0,5 gram, dan glukosa 0,25 gram. Kemudian semua bahan dilarutkan dalam akuades sebanyak 100 mL dalam labu erlenmeyer dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 1 atm selama 15 menit. Sedangkan media fermentasi yang digunakan terdiri dari  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 gram, NaCl 2,5 gram,  $\text{MgSO}_4$  0,05 gram, pepton 5 gram, dan *yeast extract* 5 gram, dan glukosa 2,5 gram yang dilarutkan dalam akuades sebanyak 1000 mL dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  tekanan 1 atm selama 15 menit.

**b. Inokulasi *Bacillus subtilis* ITBCCB148**

Sebanyak 3 ose *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dari media agar miring dipindahkan ke dalam 100 mL media inokulum secara aseptik lalu dikocok dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam.

**c. Produksi enzim protease**

Produksi enzim protease dilakukan dengan memindahkan sebanyak 2% media inokulum dari jumlah media fermentasi ke dalam media fermentasi secara aseptik lalu dikocok menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 72 jam( Nurhaeni, 2015).

**2. Isolasi enzim protease**

Isolasi enzim protease dilakukan menggunakan metode sentrifugasi. Prinsip sentrifugasi berdasarkan kecepatan sedimentasi dengan cara pemusingan. Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan enzim ekstraseluler dari sisa-sisa sel. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (di bawah suhu kamar) untuk menjaga kehilangan aktivitas enzim (Suhartono, 1989). Untuk memisahkan enzim dari komponen sel lainnya digunakan metode sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim yang selanjutnya diuji aktivitasnya dengan metode Kunitz dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.



### **3. Uji aktivitas enzim protease metode Kunitz**

#### **a. Pembuatan pereaksi uji aktivitas enzim protease dengan metode Kunitz.**

Uji aktivitas enzim protease dengan metode Kunitz diawali dengan pembuatan pereaksi.

1. Larutan Kasein : 1 gram kasein dilarutkan dalam 100 mL *buffer posfat* pH 7 pada air mendidih.
2. Larutan TCA : 5 gram TCA dilarutkan dalam 100 mL aquades.
3. Larutan standar : larutan tirosin dengan kadar 100, 200, 400, 600, dan 800 ppm.

#### **b. Uji aktivitas enzim protease metode Kunitz.**

Dimasukkan 1 mL larutan kasein dan 1 mL larutan enzim ke dalam tabung reaksi. Diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit, setelah itu diinkubasi dihentikan dengan penambahan 3 mL larutan TCA secara tepat, larutan diaduk dengan baik dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar agar pengendapan berjalan sempurna. Endapan (gumpalan protein) yang terbentuk dipisahkan dengan penyaringan atau sentrifugasi. Absorbansi filtrat diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm. Kontrol dibuat dengan memasukkan 1 mL larutan enzim, 3 mL larutan TCA, kemudian diinkubasi dengan perlakuan yang sama pada sampel. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan jumlah asam amino (peptida sederhana) yang terbentuk dengan menggunakan kurva standar Tirosin dan perhitungan metode Kunitz.

#### **4. Penentuan kadar protein metode Lowry**

##### **a. Pembuatan pereaksi uji kadar protein protease dengan metode Lowry.**

1. Uji kadar protein enzim protease dengan metode Lowry diawali dengan pembuatan pereaksi.
2. Pereaksi A : 2 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N.
3. Pereaksi B : 5 mL larutan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% ditambahkan ke dalam 5 mL larutan Na(K)-Tartarat 1%.
4. Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambah 100 mL pereaksi A.
5. Pereaksi D : reagen *follin ciocalteau* diencerkan dengan aquades 1:1.
6. Larutan standar : larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan kadar 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm.

##### **b. Kadar protein enzim protease metode Lowry**

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambah dengan 0,9 mL akuades. Lalu direaksikan dengan 5 mL pereaksi C, dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D dan diaduk dengan sempurna, didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol, 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades. Selanjutnya perlakuannya sama seperti sampel. Serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada 750 nm. Untuk menentukan kadar protein

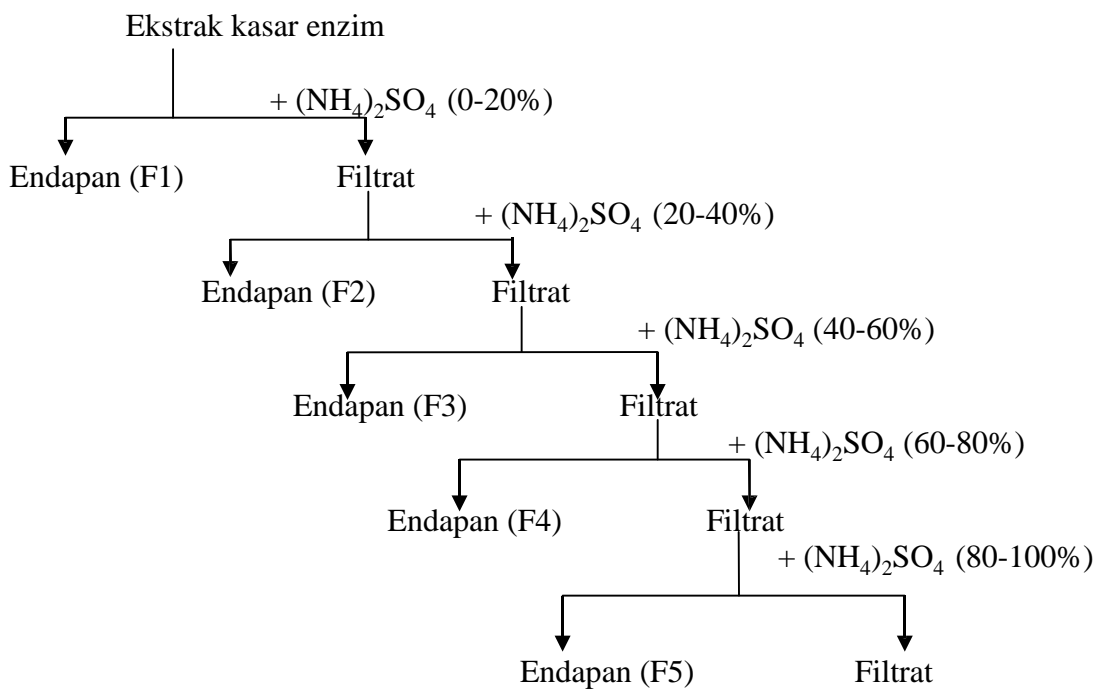
enzim digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan perhitungan metode Lowry.

## 5. Permurnian enzim protease

Setelah enzim protease diisolasi, selanjutnya enzim tersebut dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis.

### a. Fraksinasi

Ekstrak kasar enzim yang telah diperoleh selanjutnya diendapkan dengan menggunakan ammonium sulfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  pada berbagai derajat kejenuhan yaitu 0-20%; 20-40%; 40-60%; 60-80%; dan 80-100% untuk mengetahui pada fraksi mana enzim protease terendapkan. Skema fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Skema proses fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat

Sejumlah ekstrak kasar enzim yang diperoleh ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat, dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan *buffer* posfat 0,1 M pH 6,0 dan diuji aktivitasnya dengan metode Kunitz dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui pada fraksi-fraksi mana terdapat enzim protease dengan aktivitas spesifik yang tinggi.

#### **b. Dialisis**

Endapan enzim dari tiap fraksi hasil fraksinasi kemudian dimurnikan dengan cara dialisis melalui membran semipermeabel (kantong selofan). Endapan tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan *buffer* posfat pH 6 0,01 M selama 24 jam pada suhu dingin (Pohl, 1990). Selama dialisis, dilakukan pergantian *buffer* selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi.

Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  atau  $\text{BaCl}_2$  ke dalam larutan *buffer*, yaitu dengan cara mengambil sedikit *buffer* yang digunakan saat dialisis kemudian ditambahkan  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  atau  $\text{BaCl}_2$ . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih  $\text{BaSO}_4$ . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong.

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas dengan metode Kunitz dan diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

## **6. Amobilisasi enzim protease menggunakan zeolit**

### **a. Preparasi matriks zeolit**

Serbuk zeolit diayak menggunakan ayakan berukuran 120 mesh. Aktivasi zeolit alam dilakukan dengan cara mencampurkan 30 gram zeolit alam dan 100 mL HCl 3 M. Campuran dipanaskan sambil diaduk pada suhu 90°C selama 2 jam, kemudian didinginkan, disaring dan dicuci dengan aquades sampai zeolit tidak berwarna kekuningan lagi. Lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, dan disimpan dalam desikator (Septiani dan Lisma, 2011).

### **b. Penetapan pH untuk proses pengikatan enzim protease pada zeolit**

Enzim protease diikatkan pada matriks dengan variasi pH 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 dan 8 dengan menggunakan *buffer* posfat 0,1 M. Kemudian matriks diisi dengan 0,5 mL larutan enzim enzim dan dielusi dengan *buffer* yang sesuai, diaduk 5-10 menit. Campuran tersebut dibiarkan hingga matriks mengendap. Selanjutnya supernatan didekantasi dan diuji aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

### **c. Amobilisasi enzim protease**

Sebanyak 1 mL larutan enzim protease diamobil dengan zeolit pada pH optimum pengikatan. 1 mL enzim protease diikatkan pada 1 gram zeolit. Kemudian campuran diaduk hingga rata dan simpan dalam *fryzer* selama 30 menit.

Selanjutnya dicuci dengan aquades sebanyak tiga kali. Lalu dikeringkan pada suhu kamar.

#### **d. Pemakaian berulang enzim amobil**

Enzim amobil yang telah dipakai (direaksikan dengan substrat), dipakai kembali untuk direaksikan kembali dengan substrat dengan uji metode Kunitz. Pemakaian berulang ini dilakukan hingga 7 kali.

### **7. Karakterisasi enzim protease**

#### **a. Penentuan suhu optimum**

Untuk mengetahui suhu optimum kerja enzim dilakukan dengan memvariasikan suhu yaitu 50; 55; 60; 65; 70; 75 dan 80 °C. Selanjutnya aktivitas enzim diukur dengan metode Kunitz.

#### **b. Penentuan data kinetika enzim ( $K_M$ dan $V_{maks}$ )**

Nilai Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) enzim protease ditentukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan kasein) yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 dan 1,25 %. Kemudian dilakukan pengukuran dengan metode Kunitz. Selanjutnya data aktivitas enzim dengan konsentrasi substrat diplotkan ke dalam kurva *Lineweaver-Burk* untuk penentuan  $K_M$  dan  $V_M$ .

### c. Uji stabilitas termal enzim

Penentuan stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi. Waktu inkubasi dibutuhkan enzim untuk bereaksi dengan substrat secara optimum. Pada penelitian ini, uji stabilitas termal enzim dilakukan dengan variasi waktu inkubasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 menit. Selanjutnya diukur aktivitas enzim dengan metode Kunitz.

$$\text{Aktivitas sisa} = \frac{\text{Aktivitas enzim setelah perlakuan}}{\text{Aktivitas enzim awal (tanpa perlakuan)}} \times 100\%$$

(Virdianingsih, 2002).

### 8. Penentuan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ), konstanta laju inaktivasi ( $k_i$ ), dan perubahan energi akibat denaturasi ( $G_i$ )

Penentuan nilai  $k_i$  (konstanta laju inaktivasi termal) enzim protease hasil pemurnian dan hasil amobilisasi dilakukan dengan menggunakan persamaan kinetika inaktivasi orde 1 (Kazan *et al.*, 1997) dengan persamaan:

$$\ln (E_i/E_0) = - k_i t \quad (1)$$

Sedangkan untuk perubahan energi akibat denaturasi ( $G_i$ ) enzim hasil pemurnian dan hasil amobilisasi kimia dilakukan dengan menggunakan persamaan (Kazan *et al.*, 1997):

$$G_i = - RT \ln (k_i h/k_B T) \quad (2)$$

Keterangan :

R = konstanta gas ( $8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

T = suhu absolut (K)

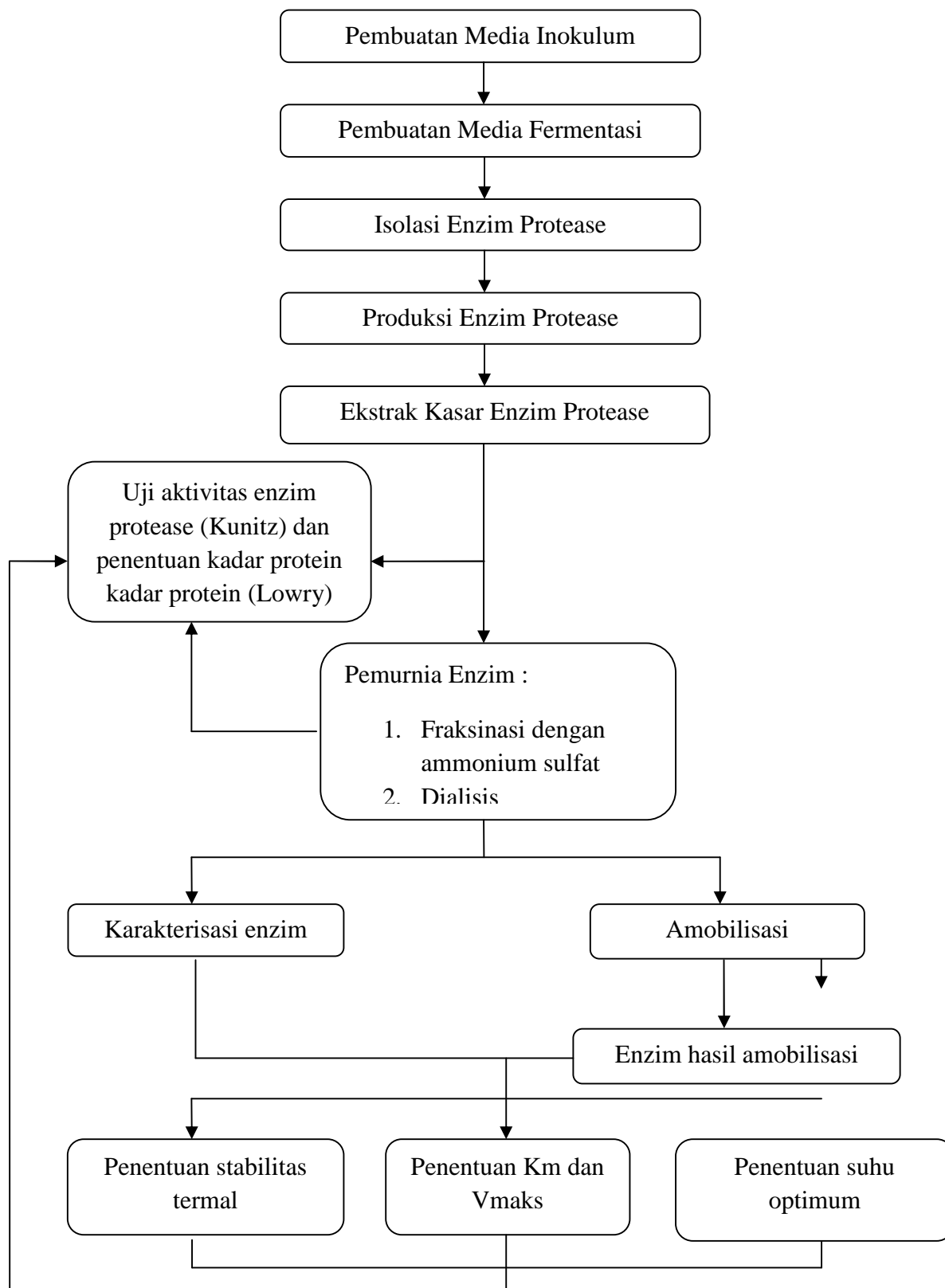
$k_i$  = konstanta laju inaktivasi termal

h = konstanta Planck ( $6,63 \times 10^{-34}$  J det)

$k_B$  = konstanta Boltzmann ( $1,381 \times 10^{-23}$  JK<sup>-1</sup>)

Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir penelitian yang ditunjukkan dalam Gambar 9.





**Gambar 9.** Diagram alir penelitian

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas spesifik enzim protease hasil pemurnian meningkat sebesar 13 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim yaitu sebesar 204,465 U/mg menjadi 2.680,734 U/mg.
2. Enzim protease hasil pemurnian memiliki suhu optimum 50°C dan enzim protease hasil amobilisasi memiliki suhu optimum 55°C
3. Uji stabilitas enzim hasil pemurnian pada suhu 60°C selama 60 menit masih memiliki aktivitas 2,215% sedangkan hasil amobilisasi pada suhu 60°C selama 60 menit masih memiliki aktivitas 16,971%.
4. Enzim protease hasil pemurnian memiliki  $K_M = 21 \text{ mg mL}^{-1}$  substrat,  $V_{maks} = 500 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 10,661 \text{ menit}$ ,  $k_i = 0,065 \text{ menit}^{-1}$  dan  $G_i = 97,667 \text{ kJ mol}^{-1}$ , sedangkan enzim hasil amobilisasi memiliki ,  $K_M = 8,6 \text{ mg mL}^{-1}$  substrat,  $V_{maks} = 200 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ . dan  $t_{1/2} = 26,653 \text{ menit}$ ,  $k_i = 0,026 \text{ menit}^{-1}$  dan  $G_i = 101,685 \text{ kJ mol}^{-1}$ .
5. Pada penelitian yang telah dilakukan, berdasarkan nilai  $k_i$ ,  $t_{1/2}$  dan  $G_i$  enzim hasil amobilisasi menggunakan zeolit lebih stabil dibandingkan dengan enzim hasil pemurnian.

**B. Saran**

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk penelitian lebih lanjut melakukan modifikasi enzim sehingga dapat diketahui cara yang paling tepat untuk peningkatan stabilitas enzim protease.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akiba, S., Y. Kiniura, K. Yamamoto, and H. Kumagai. 1995. Purification and characterization of a protease resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *Bioengineering*. 79:125-130.
- Ahern, T.J. and A.M. Klivanov. 1987. Why do enzyme irreversibly inactive at high temperature. *Biotec 1. Microbial Genetic Engineering and Enzyme Tecnology*. Gustav fischer. Stuttgart. New York.
- Boyer, H.W. and B.C. Carlton. 1971. Production of Two Proteolytic Enzymes by A Transformable Strain of *Bacillus subtilis*, *Arch. Biochem. Biophys.* 128:442-455.
- Boyer, R.F. 1993. *Modern Experimental Biochemistry*. Benjamin Cumming Publishing Company. San Francisco, California.
- Busto, M.D., N. Ortega, and M. Perez-Mateos. 1995. Induction of  $\alpha$ -glukosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 949-954.
- Chaplin, M.F. and Bucke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. England.
- Chibata, I. 1978. *Immobilized enzymes*. Halsted Press Book. Tokyo.
- Cooper, T.G. 1994. *The Tool of Biochemistry*. John Wiley and Sons. Canada.
- Crueger, W. and A. Crueger. 1982. *Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology*. Broch. T. D., editor Science Tech. Inc. Madison. USA.
- Eijnsink, G.H., G. Sirgit, V. Torben, and Bertus van de Burg. 2005. Directed Evolution of Enzym Stability. *Biomolecular Engineering*. Elsevier Science Inc. New York. 23: 21-30.
- Fessenden, R.J. dan J.S. Fessenden. 1992. *Kimia Organik Jilid II*. Erlangga. Jakarta.

- Gaman, P.M dan K.B. Sherrington. 1994. *Ilmu pangan, Pengantar Ilmu pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi*. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Girindra, A. 1986. *Biokimia I*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Gooddette, D.W., C. Terri, F.L. Beth, L. Maria, R.M. Jonathan, P. Christian, B.R. Robert, S.Y. Shiow and C.R. Wilson. 1993. Strategy and Implementation of a System for Protein Engineering. *J. Biotechnol.* 28 : 41-54.
- Gupta, S. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Alih bahasa oleh Dr. Julius E. S. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Grisham, C. M. and H.G Reginald. 1999. *Biochemistry*. Saunders College Pub. Philadelphia.
- Huang, G., T. Ying, P. Huo and J. Jiang. 2006. Purification and characterization of a protease from thermophilic *Bacillus* stain HS08. *African. Biotechnol.* 5:2432-2438.
- Illanes, A. 1999. Stability of Biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*. Universitas Catolica de Valparaiso. Chile. 2(1)
- Junita. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus stearothermophilus* Dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kristanti, N. D. 2001. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraseluler dari Kapang *Rhizopus oryzae* TR 32. *Tesis*, Program Pascasarjana, IPB. Bogor.
- Kazan, D., H. Ertan and A. Erarslan. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 48: 191-197.
- Lay, B. W., dan H. Sugyo. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Press. Jakarta. 107-112, 225.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Alih bahasa oleh Maggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Lisley, S., and M. Elain. 1992. *Solid State Chemistry*. Chapman & Hall. London.
- Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193-265.
- Martins, M.L.L., and W.C.A., Nascimento. 2006. Studies on stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with Commercial detergent. *Brazilia. Microbiol.* 37:307-311.

- Martoharsono dan Soeharsono. 2006. *Biokimia jilid I*. UGM press. Yogyakarta.
- Mozhaev, V.V., and K. Martinek. 1984. Structur-Stability Relationship in Protein: New Approaches to Stabilizing Enzymes. *Enzyme Microbial Technology*. 50-59.
- Page, D.S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Page, D.S. 1997. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Payne, G., V. Bringi, C. Prince, and M. Shuler. 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers. Munich-Vienna. 177-223.
- Pelczar, M.J., dan E.C.S. Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI-Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. 155, 158-160.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Pohl, T. 1990. *Concentration of Protein Removal of Salute dalam M.P. Deutscher, Methods of Enzymology. Guide to Protein Purification*. Academic Press. New York.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York. 212.
- Rodwell, V.W. 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.
- Sariningsih, R. 2000. Produksi Enzim Protease Oleh *Bacillus subtilis* BAC-4. *Skripsi*. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Sastrodinoto, S. 1980. *Biokimia Umum I*. PT. Gramedia. Jakarta.
- Schelege, H.G. and K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. UGM. Yogyakarta.
- Scopes, R.K. 1982. *Protein Purification*. Springer Verlag. New York.
- Senda, S.P. 2005. *Zeolit Alam*. USU. Sumatera Utara.
- Septiani, U., dan A. Lisma. 2011. Pemanfaatan Zeolit Alam Sebagai Media Pendukung Amobilisasi -Amilase. *Skripsi*. Universitas Andalas. Padang.
- Setter, K.O. 1996. Exstremophiles and their adaptation to hot environment. *Minireview*. FEBSL etters. 425:22-23.

- Shahib, M.N. 2005. *Biologi Molekuler Medik I*. Universitas Padjajaran Press. Bandung.
- Smith, J.E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. Diterjemahkan oleh U.F. Sumo, B. Sumantri, dan Subono. Penerbit Gramedia. Jakarta.
- Smith, J.E. 1997. *Prinsip Bioteknologi*. Diterjemahkan oleh U.F. Sumo, B. Sumantri, dan Subono. Penerbit Gramedia. Jakarta.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim and Bioteknologi*. PAU. Bioteknologi ITB. Bogor. 322.
- Suhartono, M.T., A. Suwanto, dan H. Widjaja. 1992. *Diklat Struktur dan Biokimiawi Protein*. Penelitian Antar Universitas. IPB. Bogor.
- Suklha S.S., K.L. Dorris, A. Suklha, and J.L. Margrave. 2003. Adsorption of Chromium from Aqueous Solution by Maple Sawdust. *J. Haz Mater.* 12: 1-3.
- Susanto, H., Budiyono, Sumantri, dan Aryanti. 2003. *Amobilisasi Enzim dengan Menggunakan Membran Mikrofiltrasi, Laporan Kegiatan*. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sutarti, M., dan M. Rachmawati. 1994. *Zeolit Tinjauan Literatur*. PDII LIPI, Jakarta.
- Viridianingsih, R. 2002. Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Protease dari *Bacillus pumilus y1* dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wagen, E.S. 1984. *Strategies for increasing the stability of enzymes, in Enzymeengineering*. The New York Academy of Sciences. New York. 1-19.
- Walsh, G. And D.R. Headon. 1994. *Immobilized Enzym*. John Wiley and Sons Ltd. New York. 1-9.
- Wang, D.I. 1979. *Fermentation and Enzymes Technology*. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Williamson, K.L and L.F. Fieser. 1992. *Organic Experiment 7<sup>th</sup> Edition*. D C Health and Company. United States of America.
- Winarno, F. G 1982. *Enzim pangan dan gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F. G 1986. *Enzim pangan dan gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- Wirahadikusumah, M. 1989. *Biokimia : Protein, Enzim dan asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia : Protein, Enzim dan asam Nukleat*. ITB Press. Bandung.
- Wiseman, A.S. 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology, 2nd ed.* Ellies Harwood Lim Chicester.
- Witazora, Y. 2008. Peningkatan Kestabilan Enzim Protease dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan Modifikasi Kimia menggunakan Dimetiladipimidat. *Skripsi*. Universitas Lampung. Lampung.
- Yandri, A.S., D. Herasari. dan T. Suhartati. 2007. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Protease Termotabil Dari Bakteri Isolat Lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Jurnal Sains MIPA* . **13**(2): 100-106.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Jakarta.