

# Pengaruh Ion $Zn^{2+}$ Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Isolat *Bittern* Tambak Garam Madura

Desi Sri Rejeki<sup>\*</sup>), Mukhammad Asy'ari<sup>\*</sup>), Wuryanti<sup>\*</sup>)

<sup>\*</sup>Lab. Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro Semarang

## Abstrak

*Bittern* adalah pekatan sisa proses pembuatan garam yang merupakan tempat pertumbuhan mikroorganisme halofilik (tahan garam tinggi). Salah satu mikroorganisme halofilik adalah bakteri halofilik. Protease merupakan salah satu enzim yang dapat diisolasi dari bakteri halofilik dan berfungsi sebagai biokatalis dalam reaksi hidrolisis protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas protease adalah adanya ion logam transisi seperti ion  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Ti^{2+}$ . Ion  $Zn^{2+}$  dapat berperan sebagai aktivator atau deaktivator pada aktivitas protease. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh enzim protease ekstraseluler dari bakteri halofilik dan menentukan pengaruh ion  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas protease dari bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura. Penentuan aktivitas protease menggunakan substrat azokasein dan penentuan kadar protein dilakukan dengan metode *Lowry*. Penentuan pengaruh ion  $Zn^{2+}$  dilakukan dengan menambahkan zat pengkhelat  $Na_2EDTA$  dalam berbagai variasi ke dalam larutan sampel yang sudah ditambahkan dengan larutan  $ZnCl_2$ . Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa protease dapat diisolasi dari bakteri halofilik stok media HSB (*Halophile Synthetic Broth*) isolat *bittern* tambak garam Madura. Aktivitas tertinggi terdapat pada Fraksi 1 (0-20 %) yaitu 11,22 unit/mg protein. Pengaruh ion  $Zn^{2+}$  dapat menurunkan aktivitas protease halofil.

Kata Kunci: Ion  $Zn^{2+}$ , Protease, Bakteri *Halofilik*, *Bittern*, Azokasein, *Lowry*.

## The Effect of $Zn^{2+}$ Ion on Extracellular Protease Activity of Halophilic Bacteria Isolated from *Bittern* in Madura Salt Pond

### Abstract

*Bittern* is the concentrated solution at by product from salt processing as a place for halophilic microorganism growth (hold up high salt). One type of halophilic microorganism is halophilic bacteria. Protease is one of enzyme that can be isolated from halophilic bacteria and functions as biocatalys in protein hydrolysis reaction toward oligopeptide and amino acid. One of factors that can affects protease activity is transition metal ion, such as  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Ti^{2+}$ .  $Zn^{2+}$  ion can be protease activity activator or deactivator. The experiment was purposed to get extracellular protease enzyme from halophilic bacteria and to determine  $Zn^{2+}$  ion effect on protease activity from *bittern* isolate halophilic bacteria in Madura salt pond. The determination of protease activity was done by using azocasein as a substrate and determination of protein content was done by doing are *Lowry* methode. Determination of  $Zn^{2+}$  ion effect was done by adding  $Na_2EDTA$  as chelating agent in any concentration to sample solution that had been added with  $ZnCl_2$  solution. Result of this research are concluded that protease can be isolated from halofilik bacteria in *Halophile Synthetic Broth* (HSB) medium stock *bittern* isolated from Madura salt pond. The highest specific activity in the first fraction (0-20%) was 11.22 unit/mg of protein. The  $Zn^{2+}$  ion influence is decrease halophile protease activity.

Keywords:  $Zn^{2+}$  ion, Protease, Halophilic Bacteria, *Bittern*, Azocasein, *Lowry*.

## PENDAHULUAN

Salah satu pusat industri garam yang cukup besar di Indonesia, adalah Madura. Pada proses pembuatan garam, terdapat sisa pemekatan (*bittern*) yang sangat bermanfaat. Hal ini dikarenakan dalam *bittern* terdapat mineral-mineral seperti:  $MgSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $KCl$ , dan juga mikroorganisme halofilik, diantaranya adalah bakteri halofilik yang dapat menghasilkan enzim protease. Bakteri halofilik

merupakan jenis mikroorganisme yang habitatnya berada pada kadar garam tinggi, karena membutuhkan konsentrasi  $NaCl$  tertentu untuk pertumbuhannya. Bakteri ini dapat ditemukan dalam *bittern* yaitu hasil pemekatan sisa dalam proses pembuatan garam (Dassarma dan Arora, 2001). Bakteri halofilik sangat bermanfaat karena dapat menghasilkan protein-protein enzim yang tahan pada kadar garam tinggi (Oren, 2003). Salah satu enzim yang dapat diisolasi dari bakteri halofilik adalah protease. Protease halofil

dapat dimanfaatkan dalam bidang industri, salah satunya yaitu pada industri kecap (Soedjarwo, 1982).

Protease halofil dapat menyesuaikan diri pada kondisi lingkungan dengan kadar garam tinggi atau memerlukan garam untuk aktivitasnya (Dassarma dan Arora, 2001). Hal ini dikarenakan sebagian besar asam amino yang menyusun protein dalam sel bakteri halofil merupakan asam amino bersifat asam, yaitu asam amino yang memiliki rantai samping gugus asam karboksilat (-COOH), misalnya asam glutamat dan asam aspartat (Edwards, 1990).

Berdasarkan sifat kimia sisi aktif enzim protease, jenis-jenis protease dapat dibedakan menjadi: protease serin, protease sulfhidril, protease logam dan protease asam (Winarno, 1986). Protease logam spesifik dapat dihambat dengan senyawa EDTA (Kamelia dkk., 2005) begitu juga protease serin dapat dihambat dengan EDTA (Clemmons, 2003).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah inhibitor. Terbentuknya kompleks enzim inhibitor (EI) akan menurunkan aktivitas enzim terhadap substrat (Poedjiadi, 1994). Logam transisi dapat digolongkan sebagai inhibitor enzim. Sebagian logam transisi yang dapat berperan sebagai inhibitor protease serin diantaranya yaitu  $Ti^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Zn^{2+}$  (Vidyasagar *et al.*, 2006).

Menurut Widowati dkk., (2000), penambahan 0,5 mM; 1 mM dan 1,5 mM  $ZnCl_2$  pada isolat protease dari bakteri *Bacillus circulans 9b3* dapat menurunkan, meningkatkan dan kembali menurunkan aktivitas protease menjadi 91 %, 101 % dan 95 %, sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan  $ZnCl_2$  dengan konsentrasi tertentu dapat menurunkan dan meningkatkan aktivitas protease.

Salah satu cara untuk menentukan pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim dapat dilakukan dengan penambahan suatu senyawa pengkhelat, salah satunya adalah EDTA. Senyawa EDTA yang biasa digunakan dalam bentuk garam yaitu  $Na_2EDTA$  (Arsyad, 2001).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan isolasi protease ekstraseluler dari isolat bakteri stok media HSB dan menentukan pengaruh ion  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas protease ekstraseluler dari bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura. Tahapan penelitian ini meliputi: peremajaan isolat stok media HSB, morfologi bakteri dan pewarnaan Gram, produksi, isolasi dan pemurnian enzim, uji aktivitas spesifik protease dan penentuan pengaruh ion  $Zn^{2+}$  dengan menambahkan 2,5 mM  $ZnCl_2$  dan variasi  $Na_2EDTA$  terhadap aktivitas protease halofil.

## BAHAN DAN CARA KERJA

**Bahan.** Tripton (Conda), yeast ekstrak (Conda), glukosa pa.,  $KH_2PO_4$  pa., NaCl pa., kasein pa., akuades, ASW (*Artificial Sea Water*) p.a., reagen Lowry C, reagen Lowry D, BSA (*Bovine Serum Albumin*), alkohol 70 % (Merck), TCA (*Tri Chloroacetic Acid*) p.a., Azokasein (Sigma), larutan kristal ungu (Merck), larutan Iodin (Merck), larutan alkohol-aseton (Merck), larutan safranin (Merck), bufer fosfat pa., NaOH p.a,  $ZnCl_2$  pa., dan  $Na_2EDTA$  pa.

**Alat.** Tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, lampu spiritus, penangas air, pengaduk gelas, penyaring gelas, botol semprot, inkubator (*Memmert*), *shaker inkubator* TIT (TS-330 A), sentrifugator (*Centrif- 228*), *shaker water bath incubator* (*Memmert*), autoklaf (*Clinical Autoclave Prestige Medical series 2100*), autoklaf (*Napco model 8000-DSE autoclave*), timbangan analitik, mikroskop beserta *slide* mikroskop, lemari pendingin (*Sanyo SR-LV 239 N*), mikropipet (*Swiss made*), *magnetic stirrer* (*Nuova*), spektrofotometer *UV-Vis* (*Shimadzu*), membran selofan (Sigma), *aluminium foil*, kertas label, kertas saring, kapas dan peralatan gelas lainnya.

## Cara Kerja

### 1. Mikroorganisme

Penelitian ini menggunakan bakteri Halofilik yang diisolasi dari koloni tunggal isolat *bittern* stok media HSB (*Halophile Synthetic Broth*).

### 2. Produksi Enzim

Isolat bakteri dari stok media HSB diremajakan kembali dengan menginokulasikan 10  $\mu$ L isolat bakteri ke dalam 50 mL ditumbuhkan pada media HSB baru yang terdiri dari: 2 g glukosa, 1 g tripton, 1 g ekstrak ragi, 1 g  $KH_2PO_4$ , 20 g NaCl, 20 mL ASW (*Artificial Sea Water*) dan akuades. Kemudian diinkubasi dalam *orbital shaker incubator* pada suhu 37 °C selama 48 jam dengan kecepatan 250 rpm. (Kanlayakrit dan Bovorneurogroj (2003); Dodia dkk., 2006). Selanjutnya, dilakukan pengamatan morfologi dan pewarnaan gram dengan mengambil 2-3 tetes kultur bakteri hasil peremajaan. Setelah diamati, kemudian kultur tersebut, diinokulasi untuk pembuatan *starter*. Dari *starter* diinokulasikan kembali untuk produksi enzim. Produksi enzim dilakukan dengan volume 1 liter media HSB dan diinkubasi dalam *orbital shaker incubator* pada suhu 37 °C selama 32 jam (sesuai waktu optimum kurva pertumbuhan yang dilakukan oleh Handayani, 2009).

### 3. Fraksinasi dengan Garam Amonium Sulfat

Enzim ekstrak kasar dari hasil produksi enzim, dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-10 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % dan 80-100 %. Endapan dari setiap fraksi dipisahkan dengan sentrifugasi 14.000 rpm selama 30 menit. Kemudian filtrat dilarutkan dengan bufer fosfat 0,05 M pH 7,0. Selanjutnya didialisis dengan menggunakan membran selofan dan direndam dalam bufer fosfat 0,0005 M pH 7,0 dalam keadaan dingin. Setiap 2 jam duji kandungan amonium sulfat dengan penambahan BaCl<sub>2</sub>.

### 4. Penentuan Aktivitas Protease

Aktivitas protease ditentukan berdasarkan kemampuan protease menghidrolisis ikatan peptida pada substrat azokasein 2 % (b/v) selama 30 menit pada kondisi percobaan. Untuk larutan sampel, sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M, pH optimum 8,0 (Handayani, 2009), ditambah dengan 0,625 mL akuades, dicampurkan dengan 0,125 mL larutan azokasein 2 %, kemudian diinkubasi pada suhu optimum 40 °C (Wardani, 2009) selama 5 menit dalam *shaker water bath incubator*. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada suhu 40 °C selama 30 menit dalam *shaker water bath incubator*. Kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10 %. Campuran dikocok dan diinkubasi di dalam air es selama ± 5 menit. Untuk larutan blanko (t<sub>0</sub>) perlakuan sama, hanya penambahan larutan enzim dilakukan setelah penambahan larutan TCA. Kemudian, masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada  $\lambda = 440$  nm.

### 5. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Untuk menentukan aktifitas spesifik, maka dilakukan penentuan kadar protein. Kadar protein yang terlarut ditentukan dengan metode *Lowry*. Sebanyak 1,5 mL larutan protein hasil fraksinasi (EK, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> dan F<sub>5</sub>) ditambah 7,5 mL larutan *Lowry C*, diinkubasi pada suhu 25 °C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,75 mL *Lowry D* dan diinkubasi kembali pada 25 °C selama 30 menit dengan sesekali dikocok, kemudian absorbansi diukur pada  $\lambda$  optimum BSA yang telah ditentukan dengan spektrofotometer *UV-Vis*.

### 6. Penentuan Pengaruh Penambahan ZnCl<sub>2</sub>

Sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M, ditambah dengan larutan azokasein 2 %, selanjutnya ditambah 0,5 mL ZnCl<sub>2</sub> 0,5 mM (variasi konsentrasi ZnCl<sub>2</sub>: 0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM dan 2,5 mM), kemudian dicampurkan 0,125 mL akuades dan diinkubasi pada suhu 40 °C selama 5 menit dalam *shaker water bath incubator*. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada kondisi optimum yaitu 40 °C selama

30 menit dalam *shaker water bath incubator*. Kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10 %. Untuk larutan blanko (t<sub>0</sub>) perlakuan sama, hanya penambahan larutan enzim dilakukan setelah penambahan larutan TCA. Kemudian, masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada  $\lambda = 440$  nm.

### 7. Penentuan Pengaruh Penambahan Na<sub>2</sub>EDTA

Sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M, ditambah dengan larutan azokasein 2 %, selanjutnya ditambahkan 0,5 mL Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mM (variasi konsentrasi Na<sub>2</sub>EDTA: 0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM dan 2,5 mM), kemudian dicampurkan 0,125 mL akuades dan diinkubasi pada suhu 40 °C selama ± 5 menit dalam *shaker water bath incubator*. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada kondisi optimum yaitu suhu 40 °C selama 30 menit dalam *shaker water bath incubator*. Kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10 %. Untuk larutan blanko (t<sub>0</sub>) perlakuan sama, hanya penambahan larutan enzim dilakukan setelah penambahan larutan TCA. Kemudian, masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada  $\lambda = 440$  nm.

### 8. Penentuan Pengaruh Ion Zn<sup>2+</sup> pada Kombinasi 2,5 mM ZnCl<sub>2</sub> dan Variasi Na<sub>2</sub>EDTA

Untuk menentukan pengaruh ion Zn<sup>2+</sup> atau ion Cl<sup>-</sup> pada ZnCl<sub>2</sub> yang ditambahkan dalam larutan enzim, maka dilakukan penambahan kombinasi ZnCl<sub>2</sub> dan Na<sub>2</sub>EDTA terhadap aktivitas spesifik protease, sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M, ditambah dengan larutan azokasein 2 %, selanjutnya ditambahkan 0,25 mL Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mM (variasi konsentrasi Na<sub>2</sub>EDTA: 0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM dan 2 mM), kemudian dicampurkan dengan 0,25 mL ZnCl<sub>2</sub> 2,5 mM dan 0,125 mL akuades. Campuran diinkubasi pada suhu 40 °C selama 5 menit dalam *shaker water bath incubator*. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada kondisi optimum 40 °C selama 30 menit dalam *shaker water bath incubator*. Kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10 %. Untuk larutan blanko (t<sub>0</sub>) perlakuan sama, hanya penambahan larutan enzim dilakukan setelah penambahan larutan TCA. Kemudian, masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada  $\lambda = 440$  nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Produksi Enzim

Peremajaan dilakukan untuk mengaktifkan bakteri hasil inokulasi awal. Hasil inokulasi awal ditumbuhkan dalam media selektif HSB baru. Selanjutnya larutan media HSB diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam dengan kecepatan 250 rpm pada *orbital shaker incubator*, hal ini dikarenakan bakteri

halofil dapat tumbuh optimal pada suhu 37 °C (Kanlayakrit dan Bovorneurogroj 2002; Dodia dkk., 2006) dan waktu inkubasi selama 48 jam berdasarkan waktu tumbuh optimal bakteri Halofilik.

Bakteri koloni tunggal yang ditumbuhkan dalam media HSB, selanjutnya diamati morfologi dan sifat Gramnya. Dari pengamatan tersebut, telah diperoleh hasil morfologi yang sama seperti stok sebelumnya, yaitu terdapat satu jenis koloni bakteri dengan bentuk bulat (*coccus*). Adanya pembuktian ini, maka kultur hasil peremajaan tersebut dapat digunakan untuk diinokulasi kedalam tahap berikutnya, yaitu *starter* untuk produksi enzim.

Pembuatan *starter* bertujuan untuk menyediakan inokulum yang digunakan untuk produksi enzim. Untuk memicu sintesis protease, maka dilakukan penambahan induser kasein pada waktu inkubasi 24 jam. Produksi enzim dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan enzim yang aktif dalam jumlah banyak. Hasil pemanenan produksi enzim dilakukan pada jam ke-32, karena pada waktu ini sel membelah diri secara maksimal, sehingga akan diperoleh enzim dengan jumlah yang optimal.

## 2. Fraksinasi dengan Garam Amonium Sulfat

Fraksinasi merupakan salah satu cara pemurnian protein melalui proses pengendapan. Fraksinasi amonium sulfat bertingkat dilakukan untuk memisahkan protein enzim dari protein yang lain, sehingga diperoleh tingkat kemurnian protein pada setiap fraksi. Penambahan garam amonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadi kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out*.

Fraksinasi amonium sulfat dilakukan dengan tingkat kejenuhan F<sub>1</sub>(0-20 %), F<sub>2</sub>(20-40 %), F<sub>3</sub>(40-60 %), F<sub>4</sub>(60-80 %) dan F<sub>5</sub>(80-100 %). Kemudian dilakukan pemurnian lanjut dengan dialisis. Hal ini dilakukan untuk memurnikan enzim dari garam amonium sulfat yang masih tersisa dari hasil fraksinasi. Untuk mengetahui sisa amonium sulfat yang tertinggal pada fraksi tersebut, maka dilakukan pengujian dengan larutan BaCl<sub>2</sub>.

Setelah diperoleh enzim protease yang lebih murni, maka selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas protease dan kadar protein untuk mendapatkan aktivitas spesifik

Tabel 1. Hasil Fraksinasi Protease Halofil

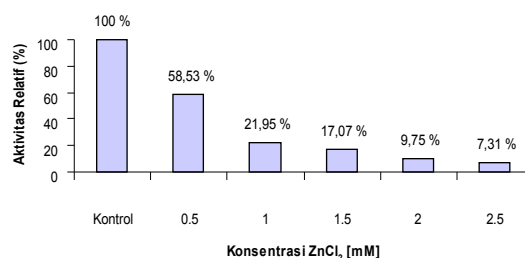
Fraksi	Unit Aktivitas (unit/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (unit/mg protein)	Tingkat Kemurnian
EK	1,7	0,704	2,414	1,000
F <sub>1</sub>	1,1	0,098	11,22	4,649
F <sub>2</sub>	0,7	0,127	5,51	2,289
F <sub>3</sub>	0,4	0,164	8,53	3,536
F <sub>4</sub>	0,8	0,093	8,60	3,563
F <sub>5</sub>	0,6	0,069	8,69	3,601

Pada saat terjadi reaksi enzimatik dalam larutan, substrat azokasein akan terurai secara hidrolisis menjadi potongan-potongan peptida kecil yang masih terikat dengan azopeptida dan menyerap pada panjang gelombang 440 nm (Kanlayakrit dan Bovornreungroj, 2003). Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis substrat azokasein 2 %, sehingga menyebabkan perubahan absorbansi sebesar 1 % per 1 mL pada  $\lambda = 440$  nm pada kondisi percobaan (Kamelia dkk., 2005).

Aktivitas spesifik adalah satu unit enzim permiligram protein (Wirahadikusumah, 1989). Adapun nilai aktivitas spesifik tersebut dapat digunakan sebagai ukuran besarnya kemurnian enzim hasil isolasi (Lehninger, 1994). Tabel 1 menunjukkan bahwa protease halofil memiliki aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi F<sub>1</sub>(0-20 %), yaitu 11,22 unit/mg protein. Hal ini membuktikan pada F<sub>1</sub>, terdapat enzim protease dengan komposisi yang paling banyak.

## 3. Pengaruh ZnCl<sub>2</sub> Terhadap Aktivitas Protease Halofil

Protease halofil memiliki banyak muatan negatif pada permukaan enzim yang berasal dari asam amino yang mengandung gugus asam pada rantai samping. Jumlah muatan-muatan negatif tersebut, akan mengakibatkan struktur tidak stabil karena ada tolakan antarmuatan negatif (Oren, 2003). Gugus asam tersebut akan berikatan dengan kation-kation yang berasal dari garam, sehingga terjadilah reaksi penetralan dan struktur permukaan protease menjadi stabil, maka aktivitas protease meningkat. Berdasarkan hasil yang diperoleh, penambahan ZnCl<sub>2</sub> cenderung menurunkan aktivitas protease seperti disajikan pada gambar 1:



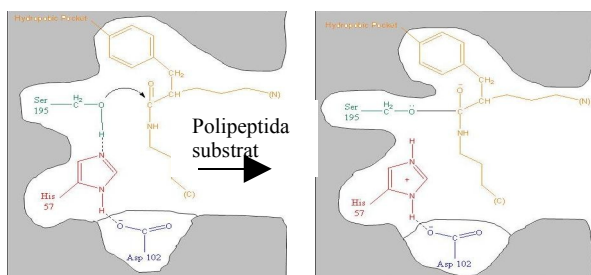
Gambar 1. Profil pengaruh penambahan ZnCl<sub>2</sub> terhadap aktivitas protease.

Muatan positif Zn<sup>2+</sup> akan menetralkan muatan-muatan negatif pada seluruh permukaan protease, dan kelebihan muatan positif Zn<sup>2+</sup> akan saling tolak menolak antarmuatan sejenis. Muatan positif Zn<sup>2+</sup> yang berlebih, akan memasuki sisi aktif protease dan berikatan dengan residu-residu asam amino yang ada.

Muatan-muatan positif  $Zn^{2+}$  cenderung terikat pada sisi aktif, karena residu asam amino pada sisi aktif bersifat lebih nukleofilik. Ion logam  $Zn^{2+}$  akan menetralkan residu asam amino pada sisi aktif dengan membentuk ikatan kovalen koordinasi. Sifat nukleofilik sisi aktif akan berkurang, sehingga hanya ada beberapa sisi aktif yang dapat berikatan dengan substrat, yaitu sisi aktif yang tidak terinhibisi oleh ion  $Zn^{2+}$ . Hal ini menyebabkan pembentukan kompleks enzim substrat (ES) menjadi lambat dan berkurang, sehingga produk yang dihasilkan sedikit dan aktivitasnya menurun. Penghambatan ini termasuk jenis penghambatan kompetitif, maka akan terbentuk dua kompleks yang terjadi yaitu kompleks enzim substrat (ES) dan enzim inhibitor (EI), disatu pihak aktif dan di lain pihak tidak aktif (Shahib, 1992).

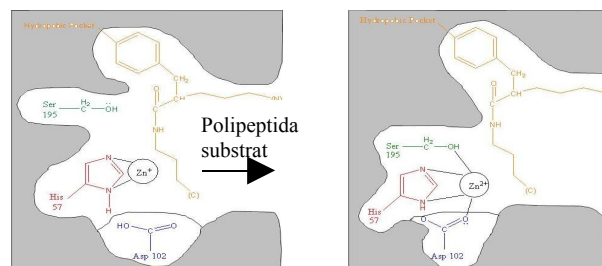
Berdasarkan studi literatur, sebagian besar protease yang diisolasi dari bakteri halofilik termasuk dalam golongan protease serin, diantaranya yaitu protease dari *Halobacillus sp.*, *Halobacterium salinarum* dan *Haloferax mediterranei* (Oren, 2003). Menurut penelitian sebelumnya, penambahan ion  $Zn^{2+}$  dapat meningkatkan protease logam dan menurunkan protease serin. Pada penelitian kali ini penambahan ion  $Zn^{2+}$  cenderung menurunkan aktivitas protease halofil, maka pembahasan mekanisme reaksi berdasarkan pada struktur sisi aktif protease serin. Adapun sisi aktif protease serin antara lain: serin pada posisi 195 (Ser 195), histidin pada posisi 57 (His 57) dan aspartat pada posisi 102 (Asp 102).

Pengaruh ion  $Zn^{2+}$  terhadap aktivitas protease serin, menyebabkan pembentukan kompleks ES dan EI. Mekanisme pembentukan kompleks ES terjadi karena adanya interaksi gugus imidazol His 57 dengan H pada serin, sehingga akan meningkatkan serangan nukleofilik O serin 195 pada C karbonil substrat. Selanjutnya,  $H^+$  dari serin 195 ditransfer ke atom nitrogen pada gugus imidazol His 57, maka terbentuk kompleks ES seperti yang disajikan dalam gambar 2:



Gambar 2. Mekanisme pembentukan kompleks ES (Mathew's dan Holde, 1990)

Sedangkan pembentukan kompleks EI oleh ion  $Zn^{2+}$  terjadi karena Ion  $Zn^{2+}$  berikatan kovalen koordinasi dengan 2 atom N dari gugus imidazol histidin 57 dan hidroksil serin 195. Sisi aktif tidak dapat berikatan dengan substrat, karena sudah berikatan dengan ion  $Zn^{2+}$ , sehingga terbentuk kompleks EI seperti yang disajikan dalam gambar 3:



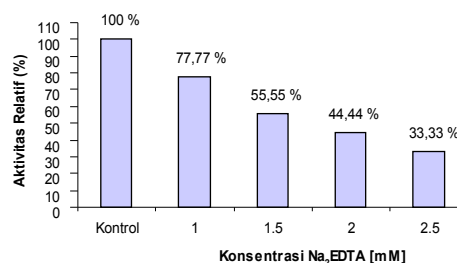
Gambar 3. Mekanisme pembentukan kompleks EI (Mathew's dan Holde, 1990; Shahib, 1992)

Penambahan ion  $Zn^{2+}$  menghalangi pembentukan kompleks ES, sehingga produk yang dihasilkan sedikit dan menyebabkan menurunnya aktivitas protease.

#### 4. Pengaruh $Na_2EDTA$ Terhadap Aktivitas Protease Halofil

Senyawa EDTA merupakan senyawa pengkhelet logam, sehingga dapat digunakan sebagai zat pengompleks. Dalam pembentukan kompleks, EDTA berperan sebagai asam Lewis atau ligan dan logam berperan sebagai basa Lewis atau ion pusat. Senyawa EDTA merupakan amina polikarboksilat dan termasuk jenis ligan multidentat, sehingga dapat berkoordinasi dengan suatu ion logam pada kedua gugus nitrogen dan keempat gugus karboksilnya. Senyawa EDTA yang biasanya digunakan dalam bentuk garam yaitu  $Na_2EDTA$  (Arsyad, 2001; Daintith, 1992).

Penentuan pengaruh penambahan  $Na_2EDTA$  disajikan pada gambar 4:

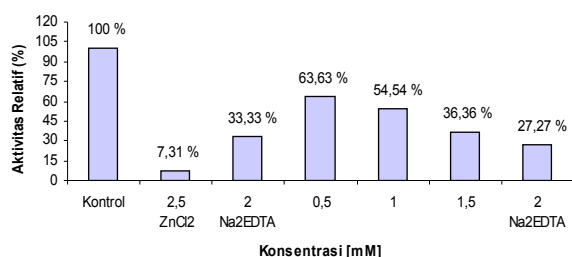


Gambar 4. Profil pengaruh  $Na_2EDTA$  terhadap aktivitas protease.

Menurut penelitian Anisa 2009, penambahan garam monovalen  $\text{Na}^+$  dapat meningkatkan aktivitas protease halofil. Pada penambahan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , terjadi penurunan aktivitas protease. Hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , maka akan semakin banyak kation  $\text{Na}^+$  dari bufer yang terikat, sehingga hanya sedikit muatan negatif yang tertetap pada permukaan. Berkurangnya muatan-muatan negatif yang tertetap, mengakibatkan tolakan antar muatan negatif akan terus berlangsung, sehingga mempengaruhi perubahan konformasi struktur protease dan aktivitasnya menurun.

### 5. Penentuan Pengaruh Ion $\text{Zn}^{2+}$ pada Kombinasi 2,5 mM $\text{ZnCl}_2$ dan Variasi $\text{Na}_2\text{EDTA}$ Terhadap Aktivitas Protease Halofil

Penambahan kombinasi 2,5 mM  $\text{ZnCl}_2$  dan variasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  bertujuan untuk menentukan ion  $\text{Zn}^{2+}$  atau  $\text{Cl}^-$  yang berpengaruh terhadap aktivitas protease pada penambahan  $\text{ZnCl}_2$ . Variasi konsentrasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yang akan ditambahkan dengan 2,5 mM  $\text{ZnCl}_2$ , antara lain: 0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM dan 2 mM. Pengaruh penambahan kombinasi  $\text{ZnCl}_2$  dan variasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  disajikan pada gambar 5:



Gambar 5. Profil pengaruh kombinasi  $\text{ZnCl}_2$  dan variasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  terhadap kestabilan struktur protease.

Penambahan kombinasi  $\text{ZnCl}_2$  dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  menyebabkan penurunan aktivitas protease, hal ini dikarenakan kation  $\text{Na}^+$  dari bufer yang akan menetralkan muatan-muatan negatif pada permukaan protease, akan terikat oleh  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  membentuk garam  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ . Setelah ditambahkan  $\text{ZnCl}_2$  dengan konsentrasi yang lebih besar dan tetap (2,5 mM) pada masing-masing variasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , maka sebagian  $\text{Zn}^{2+}$  akan berikatan dengan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan membentuk kompleks garam  $[\text{Zn}(\text{Na}_2\text{EDTA})]$ .

Semakin besar konsentrasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yang dikombinasikan dengan 2,5 mM  $\text{ZnCl}_2$ , maka akan semakin banyak  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yang mengikat ion  $\text{Zn}^{2+}$ , sehingga akan semakin sedikit jumlah ion  $\text{Zn}^{2+}$  bebas yang berpengaruh pada aktivitas protease dan aktivitasnya meningkat. Akan tetapi, aktivitas

protease yang dihasilkan menurun. Hal ini dikarenakan selain mengikat ion  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  juga mengikat kation  $\text{Na}^+$  dari bufer. Semakin besar konsentrasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , maka akan semakin banyak kation  $\text{Na}^+$  dari bufer yang terikat, sehingga masih banyak tolakan antar muatan negatif pada permukaan protease, akibatnya konformasi protease menjadi tidak stabil dan aktivitasnya menurun. Pengaruh  $\text{Na}^+$  lebih signifikan, sehingga penurunan aktivitas protease pada kombinasi  $\text{ZnCl}_2$  dan variasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dipengaruhi oleh banyaknya kation  $\text{Na}^+$  yang terikat oleh  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

Dari hasil penelitian, dapat diketahui bahwa penurunan aktivitas protease pada kombinasi  $\text{ZnCl}_2$  dan variasi  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  lebih kecil dibandingkan dengan penurunan aktivitas protease dengan penambahan  $\text{ZnCl}_2$  saja dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  saja. Hal ini dikarenakan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  tidak hanya mengikat kation  $\text{Na}^+$  dari bufer, tetapi juga mengikat kation  $\text{Zn}^{2+}$  dari  $\text{ZnCl}_2$ , sehingga jumlah kation  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Zn}^{2+}$  yang terikat  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  hanya sedikit, akibatnya masih ada kation  $\text{Na}^+$  yang menetralkan muatan-muatan negatif pada permukaan protease. Lain halnya dengan penambahan  $\text{ZnCl}_2$  saja, jumlah ion  $\text{Zn}^{2+}$  yang mempengaruhi protease lebih banyak, sehingga mempunyai tingkat inhibisi yang lebih besar, akibatnya penurunan aktivitas protease lebih besar. Begitu juga dengan penambahan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  saja, maka jumlah ion  $\text{Na}^+$  yang terikat semakin banyak, sehingga penetralan pada permukaan protease semakin sedikit, akibatnya struktur permukaan protease menjadi tidak stabil dan aktivitasnya menurun.

### KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Telah diperoleh protease dari bakteri halofilik stok media HSB (*Halophile Synthetic Broth*) isolat *bittern* tambak garam Madura. Aktivitas protease tertinggi terdapat pada Fraksi 1 (0-20 %) yaitu 11,22 unit/ mg protein.
2. Pengaruh ion  $\text{Zn}^{2+}$  dapat menurunkan aktivitas protease halofil isolat *bittern* tambak garam Madura.

### UCAPAN TERIMA KASIH

1. Bapak Mukhammad Asy'ari, M.Si. selaku Pembimbing I sekaligus Dosen Wali yang telah banyak memberikan dukungan dan nasehat kepada penulis selama penelitian dan penulisan.
2. Ibu Dra. Wuryanti, M.Si. selaku Pembimbing II yang telah memberikan dukungan dan nasehat kepada penulis selama penelitian dan penulisan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anisa, S., 2009, "Pengaruh Garam Monovalen (NaCl dan KCl) dan Divalen ( $\text{CaCl}_2$  dan  $\text{MgCl}_2$ ) Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Isolat *Bittern* Tambak Garam Madura", *Skripsi SI Kimia*, FMIPA, UNDIP, Semarang, 37 dan 39.
- Arsyad, M. N., 2001, "Kamus Kimia", Penerbit Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 96.
- Chang, R., 2004, "Kimia Dasar Prinsip dan Terapan Modern", Edisi Ke-3, Jilid 1, Penerbit Erlangga, Jakarta, 98-99.
- Clemmons., 2003, "Porcine Aortic Smooth Muscle Cell Secrete a' Serin Protease for Insulin-like Growth Factor Bindin Protein-2", Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Ontario, Canada, 47.
- Dassarma, S. dan Arora, P., 2001, "Halophiles", *Encyclopedia of life sciences*, 112-124.
- Dodia, M. S., Joshi, R.H., Patel, R. K., dan Singh, S. P., 2006, "Characterization and Stability of Extracellular Alkaline of Extracellular Alkaline Proteases from *Halophilic* and *Alkaliphilic* Bacteria Isolated from Saline Habitat of Coastal Gujarat India", Vol 37, *Brazilian Journal of Microbiologi*, 96-97.
- Handayani, N. C., 2009, "Pengaruh Penambahan NaCl Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Isolat *Bittern* Tambak Garam Madura Pada Berbagai pH", *Skripsi SI Kimia*, FMIPA, UNDIP, Semarang, hal 33, 38, 41-44.
- Kamelia, R., Sindurmata, M. dan Natalia, D., 2005, "Isolasi dan karakterisasi Protease Intraseluler Termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1", *J. Seminar Nasional MIPA-UI*, Jakarta, 2.
- Kanlayakrit, W., dan Bovornreungroj., 2003, "Selection of Extremely Halophilic Bacteria Producing Salt-loving Protease for Fish Sauce Fermentation", 185-192. *In Proceeding of 41<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference*. 3-7 February, 2003, Bangkok, Thailand.
- Lehninger, A. L., 1994, "Dasar-dasar Biokimia", Jilid 2, Alih bahasa: Maggy, T., Erlangga, Jakarta, 234-239.
- Mathew's dan Holde V., 1990, "Biochemistry", McGraw-Hill Publishing, 358-392.
- Oren, A., 2003, "Halophilic Mikroorganisme and Their Environment", Kluwer Academic Publisher, 142-143, 145-146, 158-162.
- Shahib, M. N., 1992, "Pemahaman Seluk Beluk Biokimia dan Penerapan Enzim", P. T. Citra Aditya Bakti, Bandung, 41-43, 47.
- Soedjarwo, E., 1982, "Produksi Kecap", PT. Penebar Swadaya, Jakarta, 16.
- Vidyasagar, M., Prakash S., Litchfield C., dan Sreeramulu K., 2006, "Purification and Characterization of a' Thermostable, *Haloalkaliphilic Extracellular Serine Protease* from The Extreme *Halophilic Archaeon Halogeometricum Borinquense* strain TSS101", Heron Publishing Victoria, Kanada, 51-57.
- Wang, Q. M., dan Johnson, R. B., 1997, "Enzymatic Characterization of Refolded Human Rhinovirus Type 14 2A Protease Expressed in *Escherichia coli*", Lilly Research Laboratories, Indianapolis, India, Vol :72, 1683-1686.
- Wardani, R. K., 2009, "Pengaruh Penambahan NaCl Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Sumber Isolat *Bittern* Madura Pada Berbagai Suhu", *Skripsi SI Kimia*, FMIPA, UNDIP, Semarang, 36.
- Widowati, S., Sukarno, L., dan Raharto, P., 2000, "Studi Pengaruh Penambahan Mineral terhadap Aktivitas Protease dari *Bacillus circulans* 9b3", Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor, 236-244.
- Winarno, F. G., 1983, "Enzim Pangan", P.T. Gramedia, Jakarta, hal 61-62, dan 100.
- Wirahadikusumah, M., 1989, "Protein, Enzim dan Asam Nukleat", ITB, Bandung, 34, dan 60-62.