

## Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium* spp. T11-3

### The Characterization of Extracellular Protease *Clostridium* spp. T11-3

Loli Natalia<sup>1</sup>, Lily Nathalia<sup>2</sup>, Anja Meryandini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, F MIPA IPB Jalan Raya Pajajaran 41 Bogor 16144 Tel 0251 – 377169

Email: ameryandini@yahoo.com, \*penulis untuk korespondensi

<sup>2</sup>Balai Penelitian Veteriner, Jalan Martadinata, Bogor 16144

#### Abstract

Protease is one of the leather commercial enzymes which is widely used such in food processing, medicine and leather industry. *Clostridium* sp T11-3 was isolated from Tiu Jeruk River in Nusa Tenggara Barat. Sequence analysis of 16S rRNA indicated that *Clostridium* spp T11-3 was closely related to *C. bifermentans*. This isolate produced maximum protease activity after 18 hours of cultivation in liquid media. Protease of *Clostridium* spp 11-3 displayed maximum activity at pH 5 and 60°C with casein as substrate. In the presence of 1 mM divalent ion Mg<sup>2+</sup> the enzym activity increased to 141 %, while others ion divalent (Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup>) inhibited protease activity.

**Key word:** *Clostridium* spp T11-3, protease Extracellular, divalent ion

Diterima : 15 Juli 2004, disetujui : 20 September 2005

## Pendahuluan

Protease merupakan salah satu enzim komersial yang paling banyak dimanfaatkan oleh industri, antara lain pada industri keju, pengempukan daging, farmasi, penyamakan kulit, deterjen (Mc Kane & Kandel, 1999, Collignan & Montet, 1998, Rao *et al.*, 1998). Disamping penggunaannya dalam bidang industri, kini protease mulai digunakan dalam bidang kesehatan sebagai terapi bagi penderita kanker paru-paru, lambung, ovari, serviks, dan kanker kolon. Protease juga digunakan secara bersamaan dengan terapi konvensional seperti operasi, kemoterapi dan radiasi (Murray, 2004).

Protease komersial yang dihasilkan oleh mikroba merupakan protease ekstraseluler. Data protease yang berasal dari bakteri anaerob masih sangat sedikit. *Clostridium* adalah bakteri anaerob yang bersifat gram positif, berbentuk batang dan membentuk endospora, dan mampu memproduksi protease jenis-jenis *Clostridium* yang telah berhasil diisolasi proteasenya diantaranya dari *Clostridium*

*acetobutylicum*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. histolyticum* dan *C. bifermentans* (Croux *et al.*, 1990, Enggel *et al.*, 2004).

*Clostridium* spp T11-3 merupakan salah satu galur dari lima galur yang memiliki indeks proteolitik yang cukup besar. Bakteri itu diisolasi dari sungai Tiu Jeruk, Nusa Tenggara Barat. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi protease yang dihasilkan oleh *Clostridium* spp T11-3.

## Metode Penelitian

### Identifikasi isolat

Isolat *Clostridium* spp T11-3 merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi FMIPA IPB yang diisolasi dari sungai Tiu Jeruk di Nusa Tenggara Timur. Isolat *Clostridium* sp T11-3 dianalisis menggunakan 16S-rRNA bakteri Untuk amplifikasi sekitar 1500 pb digunakan 2 primer spesifik F5 (5' CGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCC

TGGCTCAG 3') dan R5 (5' CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTATC CAGCC 3'). Kondisi PCR yang digunakan: pre-PCR 95°C 5 menit; denaturasi 95°C, 30 detik; penempelan primer 50°C, 30 detik; pemanjangan primer 72°C, 2 menit, dan pasca-PCR 50°C, 5 menit 72°C 5 menit. Data sekuen gen 16S-rRNA dibandingkan dengan data yang ada pada Genbank. Analisis sekuen menggunakan program European Bioinformatics Institut (<http://www.ebi.ac.uk>).

### **Produksi Protease**

Produksi protease dilakukan dalam botol bertutup ulir. Inokulum sebanyak 2% ( $OD_{650nm} = 0.800$ , yaitu  $10^8$  sel/ml) diinokulasikan ke dalam media produksi yang terdiri atas  $Na_2HPO_4$  0.8 g/l,  $NaH_2PO_4$  0.2 g/l, NaCl 4.5 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4 g/l,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.05 g/l, sodium tioglikolat 0.4 g/l, ekstrak khamir 2.5 g/l, pepton 5 g/l,  $NH_4Cl$  1 g/l, glukosa 2 g/l, dan Tween 80 0.5 ml/l (Mac Farlane & Mac Farlane 1992) dalam 1000 ml akuades dan diinkubasi pada suhu 37°C. Media produksi dijaga pada kisaran pH 7.0-7.5 dengan cara menambahkan beberapa tetes NaOH 5 M selama masa pertumbuhan. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan disentrifugasi pada kecepatan 8000 g selama 20 menit pada suhu 4°C.

Uji Aktivitas enzim dilakukan dengan metode Kulnitz yang dimodifikasi Walter (1994). Sebanyak 0.2 ml ekstrak kasar enzim direaksikan dengan 1 ml substrat kasein 2% dan 1 ml Tris-HCl pH 7.5, diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 ml (TCA) Trichloroacetic acid 0.1 M, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya suspensi disentrifugasi pada 8000 g selama 10 menit, pada 4°C. Filtrat sebanyak 1.5 ml direaksikan dengan 2 ml pewarna Folin

Ciocalteu :  $H_2O$  (1:2) dan 5 ml  $Na_2CO_3$  0.4 M, diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit, dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang 578 nm. Pengukuran kadar protein ekstrak kasar enzim dilakukan menurut Bradford (1976).

### **Karakterisasi Protease**

Ekstrak kasar enzim diujikan pada berbagai suhu inkubasi (30- 90 °C, dengan selang 10 °C) dan berbagai pH, yaitu 3.0 - 9.0, dengan selang 0.5 unit untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas protease. Penyangga yang digunakan ialah bufer sitrat fosfat untuk pH 3 – 6.5, bufer Tris HCl untuk pH 7 – 8.5 dan bufer glisin NaOH untuk pH 9.

Enam jenis kation ( $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , dan  $Co^{2+}$ ) yang berasal dari garam  $CaCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan  $CoCl_2$  ditambahkan secara terpisah dengan konsentrasi akhir masing-masing sebesar 1 mM dan 5 mM. Penambahan beberapa jenis kation divalen dilakukan untuk mengetahui pengaruh kation divalen terhadap aktivitas protease.

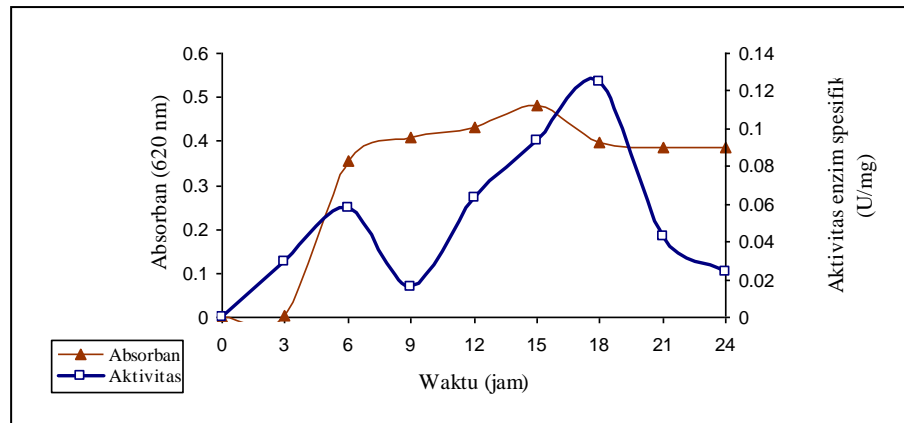
## **Hasil dan Pembahasan**

### **Identifikasi Isolat**

Dari 779 pasangan basa yang dianalisis menggunakan 16S-rRNA, *Clostridium sp* T11-3 memiliki tingkat kesamaan 94,3 % identik dengan *Clostridium bifermentans*.

### **Produksi Protease**

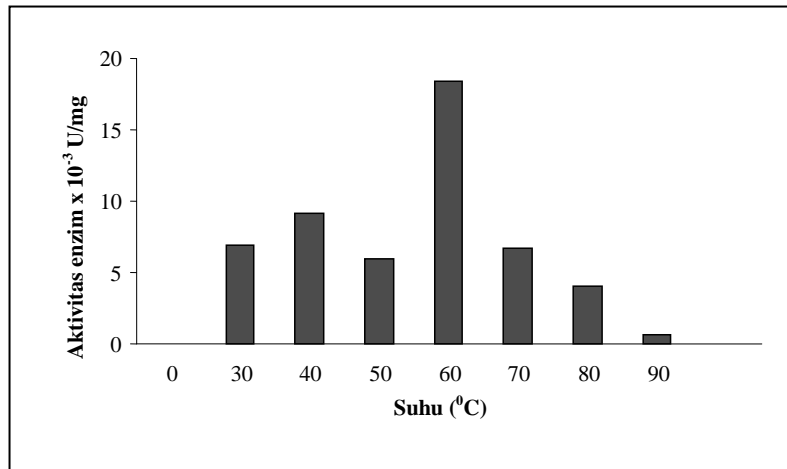
Aktivitas protease yang diukur setiap 3 jam selama masa inkubasi 24 jam mencapai aktivitas maksimum pada jam ke-18 dengan aktivitas spesifik sebesar 0.1384 U/mg (Gambar 1).



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan dan aktivitas spesifik protease *Clostridium sp* T11-3

Protease *Clostridium* sppT11-3 mencapai aktivitas maksimum pada suhu 60 °C dan pH 5 (Gambar 2 dan 3). Suhu optimum *Clostridium* sppT11-3 berbeda dengan *Clostridium bifermentans* R14-1-b (50 °C) yang diisolasi dari rumen sapi di Bogor dan *Clostridium lituseburens* Me2-3 (30 °C) yang diisolasi dari danau Meraran di NTB (Enggel *et al.*, 2004, Meryandini 2005). Suhu optimum *Clostridium*

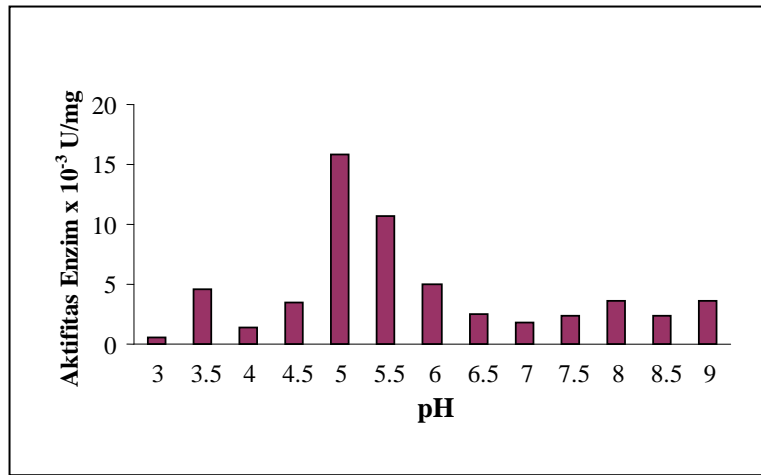
spp T11-3 sama dengan aktivitas protease *Bacillus subtilis* PE-11 (Adinarayana *et al.*, 2003), namun lebih rendah dari aktivitas protease *Thermoactinomyces candidus* yaitu 70 °C (Ignatova *et al.*, 1994). Genus lain seperti *Streptococcus reticuli* dan *Alcaligenes faecalis* memiliki aktivitas proteasenya pada suhu 55 °C (Moormann *et al.*, 1993, Thangam & Rajkumar, 2002).



**Gambar 2.** Pengaruh suhu (°C) terhadap aktivitas protease *Clostridium* spp T11-3 pada pH 7.5

Penentuan kondisi pH optimum digunakan untuk menentukan golongan protease. Protease *Clostridium* spp T11-3 merupakan protease asam. Aktivitas protease tertinggi *Clostridium* spp T11-3 dicapai pada pH 5, sedikit diatas aktivitas protease *Saccharomyces cerevisiae* yang aktif pada pH 4.8 (Roy *et al.*, 2000). Aktivitas protease pada pH 5 juga dimiliki oleh *Klebsiella oxytoca*

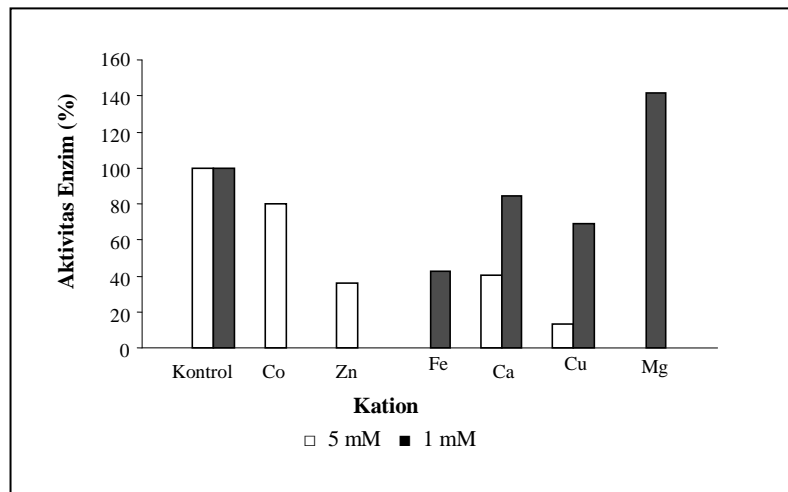
(Tondo *et al.*, 2004). *Clostridium bifermentans* R14-1-b dan *Clostridium lituseburens* Me2-3 memiliki pH optimum 7.5 (Enggel *et al.*, 2004, Meryandini 2005). Protease asam dapat digunakan dalam industri makanan (pembuatan keju, pengempukan daging) dan pengelolaan kulit (Poza *et al.*, 2003, Sloskoska *et al.*, 1999, Colligan & Montet 1998).



**Gambar 3.** Pengaruh pH terhadap aktivitas protease (U/mg) *Clostridium* spp T11-3 pada suhu 37 °C.

Penambahan 1 mM kation divalen Mg<sup>2+</sup> pada ekstrak kasar enzim meningkatkan aktivitas protease *Clostridium* spp T11-3 sebesar 141 %. Kation divalen lainnya memberikan penurunan aktivitas protease baik

pada konsentrasi 1 mM maupun pada konsentrasi 5 mM (Gambar 4). Penambahan 1 mM kation Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> dan 5 mM Mg<sup>2+</sup> menghambat aktifitas protease sehingga tidak terdeteksi.



**Gambar 4.** Pengaruh kation divalen terhadap aktivitas protease *Clostridium* spp T11-3 pada pH 5, suhu 60 °C.

Penambahan beberapa kation divalen memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap aktivitas protease. Peningkatan aktivitasnya protease *Brevibacterium linens* ATCC 9174, *Yersinia ruckeri* dan *Bacillus subtilis* PE-11 membutuhkan ion Ca<sup>2+</sup> dan Mg<sup>2+</sup> (Ratray *et al.*, 1995, Secades *et al.*, 1999, Adinarayana *et al.*, 2003), sedangkan protease *C. bifermentans* R 14-1-b membutuhkan ion Fe<sup>2+</sup> (Enggel *et al.* 2004).

Protease *C. lituseburens* Me1-3 mempunyai aktivitas yang tinggi dengan penambahan logam Co<sup>2+</sup> 5 mM (Meryandini 2005). Keberadaan logam Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> dapat menurunkan aktivitas protease *Chryseobacterium* sp galur Kr6 (Riffel *et al.* 2003), demikian juga dengan ion Zn<sup>2+</sup>, dan Co<sup>2+</sup> menghambat aktivitas protease *C. bifermentans* R 14-1-b (Enggel *et al.*, 2004).

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Penelitian Dasar 2003 dengan kontrak Nr 11/P2IPT/DPPM/PID/2003.

## Daftar Pustaka

- Adinarayana, K., Ellaiah, P. and Prasad, D.S. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus pumilus* PE-11. *Aaps Pharm Sci Tech* 4:1-9
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Croux, C., Paquet, V., Gamo, G. and Soucaille, P. 1990. Purification and characterization of acidolysin, an acidic metalloprotease produced by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* 50: 3634-3642.
- Collignan, A. and Montet, D. 1998. Tenderizing squid mantle by marination at different pH and temperature levels. *Lebensm-Wiss u-Technol* 31:673-679
- Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A. and Erarslan, A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *J. Appl. Microbiol.* 96:320 - 327
- Enggel, J., Meryandini, A. and Natalia, L. 2004. Characterization of extracellular protease from *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Mikrobiol. Ind.* Vol. 9 No 1
- Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G. and Nedkov, P. 1999. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Rev. Can. Microbiol.* 45:217-222.
- Lin, X., Lee, C., Casale, E.S. and Shih, J.C.H. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl Environ. Microbiol.* 58: 3271 – 3275.
- MacFarlane, G.T. and MacFarlane, S. 1992. Physiological and nutritional factor affecting synthesis of extracellular metalloprotease by *Clostridium bifermentans* NCTC 2914. *Appl Environ Microbiol.* 58: 1195-1200.
- Mc Kane, L. and Kandel, J. 1999. *Microbiology Essential & Application*. Ed ke-2. USA: McGraw-Hill, Inc
- Meryandini, A. 2005. Characterization of extracellular *Clostridium lituseburense* Me1-3 from Meraran Lake in East Nusa Tenggara. *Mikrobiol. Ind.* Vol. 10 No 1 pp 45-47.
- Moormann, M., Schlochtermeyer, A. and Schrempf, H. 1993. Biochemical characterization of a protease involved in the processing of a *Streptomyces reticuli* cellulase (Avicelase). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1573 – 1578.
- Murray, T. What are proteolytic enzyme. <http://dr.murray.com/article/penzyme>. [20 April 2004].
- Poza, M., Sieiro, C., Careira, L., Barros-Velazquez, J. and Villa, T.G. 2003. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30 (12): 691 - 698
- Rao, M.B., Thanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Desphande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microb Mol Biol Rev* 62(3): 597-635.
- Ratray, F.P., Bockelmann, W. and Fox, P.F. 1995. Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Appl Environ Microbiol* 61: 3454-3456.
- Riffel, A., Lucas, F., Heib, P. and Brandelli, A. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch Microbiol* 179:258-265
- Roy, M.K., Watanabe, Y. and Tamai, Y. 2000. Yeast protease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting-enzyme activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 95 – 100.
- Secades, P., Alvares, B. and Guijarro, J.A. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions of production. *Appl Environ Microbiol* 67: 3969-3975.
- Slokoska, L., Angelova, M., Pashova, S., Petricheva, E. And Konstantinov, Ch. 1999. Production of acid proteinase by *Humicola lutea* 120-5 immobilized in mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate beads. *Process Biochem* 34: 73-76
- Thangam, E.B. and Rajkumar, G.S. 2002. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol Appl Biochem* 35:149-154
- Tondo, E.C., Lakus, F.R., Oliveira, F.A. and Brandelli, A. 2004. Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. *Lett Appl Microbiol* 38:146-150
- Walter, H.E. 1994. Methode with haemoglobin casein and azocoll as substrate. Di dalam Bergmeyer HU, editor. *Methode of Enzyme Analisis*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.