

# AMOBILISASI SEL *Bacillus licheniformis* KA-08 DALAM MENGHASILKAN KERATINASE TERMOSTABIL

Anthoni Agustien

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang

E-mail: aagustien@gmail.com

## ABSTRACT

*Isolate local Bacillus licheniformis KA-08 known extracellular thermostable keratinase producers. Scale up of thermostable keratinase production can be with cells immobilized. The objective of the research is to thermostable keratinase production of B. licheniformis KA-08 cells immobilization. Thermostable keratinase activities were determined with modification of Brandelli and Riffel method. Protein concentration of enzyme determined with Lowry method. Immobilization of cells by Ca-alginate matrix with Adinarayana method, alginate concentration and amount of alginate bead effects with Beshay method. The result extracellular thermostable keratinase of B. licheniformis KA-08 cells immobilized was maximum produced at 12 times incubation with activity as 9.25 U/mg. Three percent alginate has optimum activity. Three hundred alginate beads has optimum activity. Cells immobilized of B. licheniformis KA-08 has scale up of thermostable keratinase activity at 2 times than free cells. Thermostable keratinase produced by cell immobilized was nine cycles.*

**Key words:** alginate, *B. licheniformis* KA-08, immobilization, keratinase, thermostable

## PENGANTAR

Amobilisasi sel merupakan suatu metode di mana sel ditahan pergerakannya pada suatu ruang. Ada beberapa teknik amobilisasi seperti adsorpsi, ikatan kovalen, ikat silang, dan penjejakkan. Sel amobil banyak digunakan untuk produksi enzim, asam organik dan alkohol (Ramakrishna dan Prakasham, 2007). Amobilisasi sel merupakan salah satu cara atau metode untuk meningkatkan produksi enzim, kestabilan operasionalnya tinggi, biaya murah untuk produksi enzim (Chibata, 1983), melindungi kerusakan sel, mengurangi kontaminasi, produktifitas tinggi dan proses kontrol tinggi (Quirós *et al.*, 1996).

Amobilisasi sel mikroorganisme dengan teknik penjejakkan paling diminati dan banyak digunakan (Bregni *et al.*, 2000). Pengemban yang sering digunakan sebagai matriks penjebak sel mikroorganisme adalah poliakrilamid, kolagen, gelatin, agar, alginat dan  $\kappa$ - karagenan (Scragg, 1990). Penjejakkan sel dengan menggunakan pengemban kalsium alginat merupakan yang paling disukai dan banyak dipelajari, hal ini disebabkan kehidupan dan aktivitas sel sangat tinggi (Quirós *et al.*, 1996), prosesnya satu tahap dibawah kondisi yang sangat terjaga dan sangat cocok dengan sel sehingga perolehan produknya tinggi (Bregni *et al.*, 2000). Alginat sebagai bahan pengemban banyak digunakan pada amobilisasi sel *Bacillus*, hal ini disebabkan alginat tidak bersifat racun terhadap sel, tingkat kecocokan yang tinggi dengan sel, mudah diperoleh, tekniknya sederhana dan murah (Adinarayana *et al.*, 2005; Bregni *et al.*, 2000).

Penggunaan sel amobil untuk fermentasi sangat penting sebagai alternatif bagi memperbaiki bioproses konvensional yang menggunakan sel bebas (Quirós *et al.*, 1996). Amobilisasi dari sel mikroorganisme dalam memproduksi enzim ekstraseluler adalah untuk meningkatkan produksi enzim dan memisahkan sel-sel mikroorganisme dari produk ekstrak kasar enzim (Galazzo dan Bailey, 1990). Keratinase (EC.3.4.99.11) adalah kelompok protease yang spesifik penghidrolisis keratin (Korkmaz *et al.*, 2003). Keratinase memainkan peranan penting dalam aplikasi bioteknologi seperti dalam industri penyamakan kulit, produksi asam amino dan pakan ternak (Sun dan Lee, 2001). Kelompok bakteri *Bacillus* spp. menghasilkan keratinase yang sangat efektif dalam menghidrolisis keratin (Williams *et al.*, 1990). Jenis *Bacillus* spp. termofilik penghasil keratinase termostabil adalah *Bacillus sphaericus* FK-28 (Pissuwan dan Suntornsuk, 2001), *B. pseudofirmus* (Gessesse *et al.*, 2003) dan *B. licheniformis* KA-08 (Agustien *et al.*, 2006).

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Aktivitas spesifik keratinase

Pengukuran aktivitas keratinase dilakukan menurut Brandelli dan Riffel (2005) yang telah dimodifikasi. Larutan enzim 100  $\mu$ l ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisikan 400  $\mu$ l keratin 10 mg/ml. Campuran tersebut diinkubasi pada 60° C selama 1 jam. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 1,25 ml 10% TCA.

Prosedur yang sama dilakukan pada larutan standar tirosin 5 mmol/l dan blanko berupa air suling. Pada blanko, enzim ditambahkan setelah direaksikan dengan TCA. Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit, disentrifugasi pada kecepatan 10000 xg selama 20 menit. Sebanyak 0,375 ml supernatan dipindahkan kedalam tabung yang bersih, kemudian ditambahkan 1,25 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dan 0,25 ml 1 N reagen Folin-Ciocalteu's. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  578 nm.

Penentuan kadar protein enzim dilakukan menurut metode Lowry (1951).

### Amobilisasi sel *B. licheniformis* KA-08 dan produksi keratinase (Adinaraya et al., 2005)

#### Penyediaan inokulum

Sebanyak 5 ml air suling steril di masukkan ke dalam biakan miring bakteri yang berumur 24 jam. Suspensi sel bakteri di masukkan ke dalam labu ukuran 250 ml yang berisikan 45 ml medium. Kemudian diinkubasi pada shaker 150 rpm, suhu 55° C selama 14 jam. Medium produksi enzim disentrifugasi pada 5000 g selama 20 menit. Pelet sel dilarutkan dan dicuci dengan larutan KCl 2% steril, NaCl 0,85% steril, dan air suling steril. Terakhir sel dilarutkan dengan NaCl 0,85% steril.

#### Amobilisasi sel dengan matriks alginat

Disiapkan larutan Na-Alginat 3% steril dan dicampurkan dengan 2 ml suspensi sel dan larutan alginat, distirer selama 1 menit. Sel pada larutan alginat di masukkan ke dalam *syringe* steril dan secara perlahan dikeluarkan dari *syringe* ke dalam wadah yang berisikan 0,2 M CaCl<sub>2</sub> sehingga terbentuk butiran alginat dan disimpan pada suhu 4° C selama 1 jam dan dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali.

#### Produksi enzim dengan amobilisasi sel

Butiran alginat di masukkan ke dalam labu ukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium produksi enzim. Diinkubasi selama 24 jam dan setiap interval 3 jam dilakukan sampling dan ditentukan aktivitas spesifik enzim.

#### Efek konsentrasi Ca-alginat

Efek konsentrasi Ca-alginat terhadap produksi enzim dilakukan menurut Beshay (2003), dengan membuat variasi konsentrasi pengemban alginat: 2; 2,5; 3,0; 3,5 dan 4%. Larutan enzim diisolasi dan ditentukan aktivitas spesifik enzim.

#### Efek jumlah butiran Ca-alginat

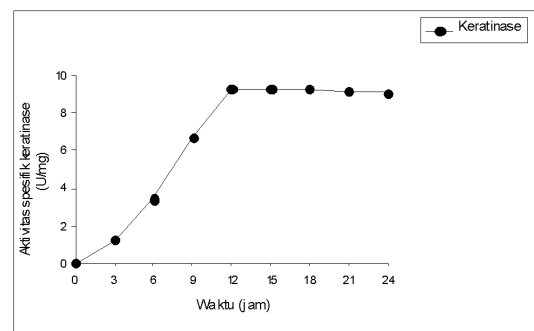
Efek jumlah butiran Ca-alginat terhadap produksi enzim dilakukan menurut Beshay (2003), dengan membuat variasi jumlah butiran alginat sebanyak: 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 butir; menggunakan konsentrasi alginat yang terbaik. Larutan enzim diisolasi dan ditentukan aktivitas spesifik enzim.

#### Penggunaan berulang sel amobil (Adinaraya et al., 2005)

Penghasilan keratinase termostabil dengan sel amobil pada kondisi konsentrasi dan jumlah butiran alginat yang terbaik. Larutan enzim diisolasi pada berdasarkan waktu panen, kemudian ditentukan aktivitas spesifik enzim dan aktivitas enzim total. Selanjutnya sel amobil dicuci 3 kali dengan menggunakan larutan NaCl 0,85%, kemudian dimasukkan medium yang baru untuk memproduksi enzim kembali, selanjutnya enzim dipanen kembali dan sel amobil dicuci kembali. Operasional sel amobil dilakukan sampai menunjukkan aktivitas keratinase termostabil menurun.

## HASIL

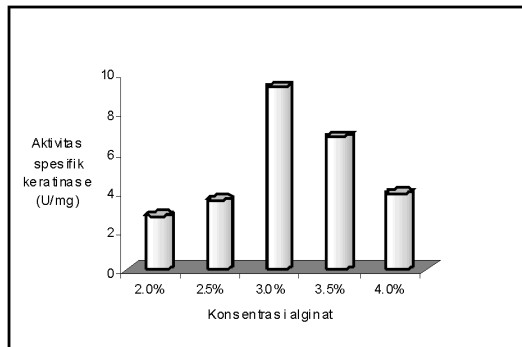
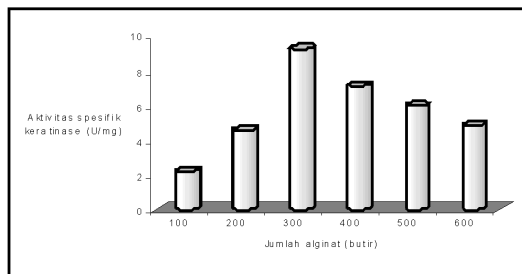
Berikut ini adalah hasil dari penelitian yang dilakukan. Produksi keratinase dari sel *B. licheniformis* KA-08 amobil dapat dilihat pada Gambar 1. Sedangkan Gambar 2 dan 3 menunjukkan pengaruh konsentrasi dan jumlah butiran alginat. Untuk penggunaan sel amobil dapat dilihat pada Gambar 4. Tabel 1 menunjukkan data produksi keratinase menggunakan sel bebas dan sel amobil.



Gambar 1. Produksi keratinase dari sel *B. licheniformis* KA-08 amobil

**Tabel 1.** Produksi keratinase menggunakan sel bebas dan sel amobil

	Akt.spesifik (U/mg)	Peningkatan (kali)
Sel bebas	4,35	
Sel amobil	9,25	2.13

**Gambar 2.** Histogram pengaruh konsentrasi alginat**Gambar 3.** Histogram pengaruh jumlah butiran alginat**Gambar 4.** Penggunaan berulang sel amobil

## PEMBAHASAN

Amobilisasi sel *Bacillus licheniformis* KA-08 menggunakan metode penjebaran dengan Ca-alginat sebagai matriks untuk memproduksi keratinase, memperlihatkan produksi keratinase maksimum dihasilkan pada 12 jam inkubasi, dengan aktivitas spesifik 9,25 U/mg. Hal yang berbeda diperlihatkan oleh *Brevibacillus agri* A-03 termofilik yang diamobilisasi dengan pengemban alginat yang menghasilkan keratinase termostabil pada

18 jam inkubasi (Agustien, 2010). Produksi keratinase dengan teknik amobil sel, tidak hanya memiliki aktivitas spesifik enzim yang lebih tinggi (9,25 U/mg) dibandingkan dengan produksi keratinase dengan menggunakan sel bebas (4,35 U/mg), juga waktu produksi keratinase dengan teknik amobil sel lebih cepat (12 jam) dibandingkan jika produksi keratinase dengan sel bebas (30 jam). Keuntungan menggunakan sel amobil dalam produksi enzim adalah meningkatkan aktivitas enzim (Galazzo dan Bailey, 1990) dan mereduksi waktu produksi enzim (Quintana dan Dalton, 1999).

Alginat dengan konsentrasi 3% dapat menghasilkan keratinase paling tinggi, dengan aktivitas spesifik enzim 9,25 U/mg. Butiran alginat dengan konsentrasi yang rendah menyebabkan butiran relatif lunak dan memungkinkan cepat terjadi kebocoran jika dibandingkan dengan alginat dengan konsentrasi tinggi sedangkan koefisien difusi glukosa menurun dengan peningkatan konsentrasi alginat (Beshay, 2003). Ca-alginat dengan konsentrasi 3%, mempunyai diameter pori yang maksimal (Hanoun dan Stephanopoulos, 1985). Keadaan pori yang maksimal menyebabkan proses transfer nutrisi dari medium ke sel bakteri yang berada dalam butiran alginat dan juga terjadi difusi produk dari sel melalui pori pengemban ke medium. Oleh karena itu, konsentrasi butiran pengemban, substrat, dan konsentrasi produk mempunyai peranan yang sangat penting dalam pertumbuhan dan produktivitas sel (Quiros *et al.*, 1995).

Jumlah butiran alginat sebanyak 300 buah dapat menghasilkan keratinase paling tinggi, dengan aktivitas spesifik enzim 9,25 U/mg. Peningkatan jumlah butiran dapat menyebabkan produksi enzim menjadi maksimum, sedangkan jumlah butiran di atas jumlah yang optimum menyebabkan reduksi terhadap perolehan enzim (Beshay 2003).

Produksi enzim dengan menggunakan sel bebas menghasilkan aktivitas spesifik keratinase sebesar 4,35 U/mg, sedangkan jika menggunakan *B. licheniformis* KA-08 amobil, aktivitas keratinase menjadi 9,25 U/mg. Sel amobil meningkatkan produksi keratinase lebih dari 100%, hal ini menunjukkan pengemban alginat sangat sesuai digunakan sebagai penjebaran sel untuk memproduksi enzim. Menurut Quiros *et al.* (1995), penjebaran sel dalam butiran alginat paling sesuai bagi viabilitas sel sehingga aktivitas sel sangat tinggi.

Penggunaan berulang sel *Bacillus licheniformis* KA-08 amobil dengan pengemban alginat untuk menghasilkan keratinase dengan aktivitas relatif masih 100% setelah digunakan sebanyak 9 kali. Adinaraya *et al.* (2005) melaporkan bahwa penggunaan berulang sel amobil

*Bacillus subtilis* PE-11, aktivitas protease masih 100% setelah 9 kali penggunaan.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan produksi keratinase dengan menggunakan sel *B. licheniformis* KA-08 amobil, enzim maksimum dihasilkan pada 12 jam inkubasi. Kondisi produksi enzim adalah konsentrasi alginat 3%, jumlah butiran alginat 300 butir, dan penggunaan berulang sebanyak 9 siklus.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian Hibah Bersaing dengan kontrak No. 126.a/H.16/PL/HB-PHB/IV/2009 Tanggal 20 April 2009.

## KEPUSTAKAAN

- Adinarayana K, Jyothi B and Ellaiah P, 2005. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. *AAPS Pharmacology Science Technology*, 6: 391–397.
- Agustien A, 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD Press, Bandung.
- Agustien A, Nurhayati Y, Udin LZ dan Aditiawati P, 2006. *Produksi Enzim Keratinase dari Bacillus spp. Asal Sumber Air Panas Ambayan Sumatera Barat*. Makalah pada Pertemuan Ilmiah Tahunan, PERMI, Solo.
- Beshay U, 2003. Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in ca-alginate beads. *African Journal of Biotechnology*, 2, 3: 60–65.
- Brandelli A and Riffel A, 2005. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(1): 1–7.
- Bregni C, Degrossi J, Garcia R, Lamas MC, Firenstein R, and D'Aquino M, 2000. Alginate microspheres of *B. subtilis*. *Ars Pharmaceutica* 41(3): 245–248.
- Chibata I, 1983. *Immobilized Enzyme*. A Halsted Press Book Kodansha Ltd. Tokyo.
- Galazzo JL and Bailey JE, 1990. Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate beads induces cell alterations that accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology Bioengineering* 36: 417–426.
- Gessesse A, Kaul RH, Gashe BA, and Mattiasson B, 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 519–524.
- Hanoun BJM and Stephanopoulos G, 1985. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell free and cell occupied calcium alginate membranes. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 829–835.
- Korkmaz H, Ünaldi MN, Aslan B, Coral G, Arıkan B, Dinçer S, and Çolak Ö, 2003. Keratinolytic activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey. *Annals of Microbiology*, 53: 85–93.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randal RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biology Chemistry* 193: 265–275.
- Pissuwan D and Suntornsuk W, 2001. Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated on Thailand. *Journal Nature Science*, 34: 171–178.
- Ramakrishna S V and Prakasham RS. 2007. Microbial fermentation with immobilized cells. <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles17.htm>, 17 Oktober 2007.
- Quintana MG and Dalton H, 1999. Biotransformation of aromatic compounds by immobilized bacterial strain in barium-alginate. *Journal Enzyme and Microbial Technology*, 24: 232–236.
- Quirós C, García LA, and Díaz M, 1996. The evolution of the structure of calcium alginate beads and cell leakage during protease production. *Process Biochemistry* 31(8): 813–822.
- Scragg AH, 1990. *Biotechnology for Engineers, Biological Systems in Technological Processes*. Ellis Horwood Limited, Publishers. Chichester.
- Sun HJ and Lee HK, 2001. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Journal Protein Chemistry* 20:165–169.
- Williams CM, Richter CS, Kenzie JMM, and Shih JCH, 1990. Isolation, Identification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 56: 1509–1515.