

## **Pengaruh Faktor Abiotik terhadap Produksi Protease dari Isolat Bakteri M1-23**

### **Influence of abiotic factors in producing protease by bacterial isolates M1-23**

Mira Rosnawita, Anthoni Agustien, dan Nasril Nasir

Laboratorium Riset Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Andalas,  
Kampus UNAND Limau Manis Padang -25163

Koresponden : [rosnawita\\_mira@yahoo.co.id](mailto:rosnawita_mira@yahoo.co.id)

#### **Abstract**

A study on the influence of abiotic factors in producing protease by bacterial isolates M1-23 was conducted from May 2013 to December 2013 in the Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Andalas University, Padang. This study aimed to find optimal conditions by isolate M1-23 to produce protease. This study consists of two stages. First stage used to produce the best protease and the second used to increase enzyme homogeneity. The result showed that the highest enzyme activity was at medium temperature 55<sup>0</sup> C and pH 7.5. The best homogeneity was produced at 125 rpm of agitation process.

#### **Pendahuluan**

Negara industri maju banyak menggunakan enzim untuk menunjang bioteknologinya, baik untuk sarana maupun analisis (Falch, 1991). Salah satu enzim yang digunakan adalah protease. Protease banyak dimanfaatkan dalam penelitian biokimia, biologi molekuler maupun industri (Wahyuntari, 2005), banyak dihasilkan oleh genus *Bacillus* (Fuad *et al.*, 2004). Industri yang memanfaatkan enzim ini adalah industri deterjen, kulit, tekstil, pengolahan limbah, makanan dan farmasi (Enggel *et al.*, 2004). Oleh karena itu, tidak mengherankan apabila protease yang digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan diseluruh dunia (Rao *et al.*, 1998). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu, pH dari lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor enzim. Menurut Brock (1986) perubahan pH menyebabkan terhentinya aktivitas enzim akibat dari proses denaturasi dan peningkatan suhu juga meningkatkan kecepatan reaksi, pada suhu terlalu tinggi akan menyebabkan denaturasi enzim.

Protease alkali merupakan jenis protease yang paling banyak diaplikasikan dalam bidang industri (Akdiya, 2003). Bakteri termofilik menghasilkan enzim alkali protease. Salah satu strategi untuk

meningkatkan produktivitas enzim dari mikroorganisme termofilik yaitu dengan optimasi komposisi media dan kondisi tumbuhnya (Winarno, 1995). Bakteri termofil menghasilkan enzim termostabil. Untuk meningkatkan produksinya perlu dilakukan optimasi seperti suhu, pH, dan agitasi.

#### **Metodologi Penelitian**

Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah metoda eksperimen, rancangan acak lengkap. Tahap I, Efek suhu inkubasi dan pH medium terhadap aktivitas enzim menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial (4x4) dengan 2 ulangan, tahap II, Efek agitasi terhadap aktivitas enzim menggunakan rancangan acak lengkap 4 perlakuan dengan 6 ulangan.

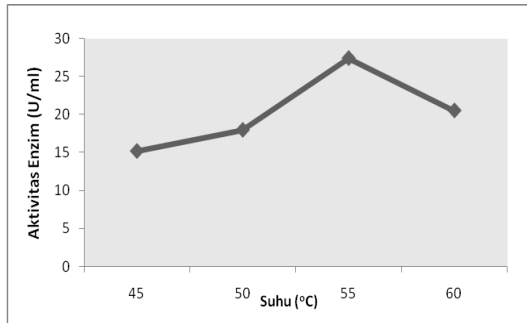
#### **Hasil dan Pembahasan**

Dari penelitian yang telah dilakukan tentang pengaruh faktor abiotik terhadap isolat bakteri MI-23 penghasil protease alkali didapatkan hasil sebagai berikut :

*Efek suhu inkubasi dan pH medium terhadap isolat bakteri M1- 23*

Hasil pengujian efek suhu inkubasi dan pH medium terhadap isolat bakteri M1-23 secara statistik menunjukkan perbedaan

yang nyata dimana F hitung perlakuan > F tabel. Interaksi faktor suhu inkubasi dan pH medium berdasarkan uji Duncan's disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Efek suhu inkubasi terhadap produksi protease.

Gambar 1 menunjukkan bahwa perlakuan suhu 55°C dan pH 7,5 memiliki aktivitas enzim paling tinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan suhu 50°C dan pH 7,5 memiliki aktivitas enzim tinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan suhu 50°C dan pH 9,0 memiliki aktivitas paling rendah tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan suhu 50°C dan pH 8,5.

Gambar 1 menunjukkan bahwa produksi protease mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan suhu inkubasi, dan setelah suhu optimum produksi protease tercapai maka laju katalitik enzim mengalami penurunan. Selain itu Gambar 1 juga menunjukkan bahwa isolat bakteri M1-23 ini menghasilkan protease pada rentang suhu 45°C -60°C. Laju reaksi optimum pada suhu 55°C dan laju reaksi enzimatis mengalami penurunan pada suhu diatas 55°C bahkan bisa mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya. Menurut Pelczar *et al.*, (1986) mulai pada suhu rendah, aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai aktivitas optimumnya dicapai.

Pada suhu tinggi enzim yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan suhu rendah. Enzim diproduksi lebih banyak setelah mencapai suhu optimum yaitu pada suhu 55°C. Dan setelah mencapai suhu optimum aktivitas enzim mengalami penurunan. Penelitian Agustien (2010), menyatakan bahwa efek suhu dan

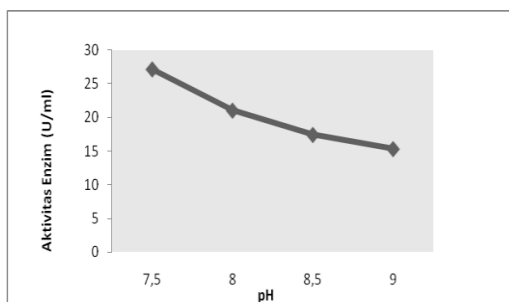
pH terhadap *Bacillus agri* A-03 dalam produksi protease alkali dan keratinase menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada suhu 55°C. Menurut Moat dan Foster (1995), suhu merupakan faktor penting bagi pertumbuhan mikroorganisme. El-Refai *et al.*, (2005) melaporkan produksi keratinase maksimum dari *Bacillus pumilus* F9 dihasilkan pada suhu inkubasi 55°C dengan nilai aktivitas enzim paling tinggi. Penelitian yang telah dilakukan oleh Kurniawan (2011), didapatkan hasil bahwa aktivitas protease dari *Bacillus* TPT-20 pada suhu 55°C menunjukkan aktivitas yang paling tinggi. Produksi enzim dibawah suhu optimum menunjukkan berkurangnya nilai aktivitas enzim protease. Walstra *et al.*, (2006) juga melaporkan bahwa aktivitas protease dari *Bacillus* sp. Strain SMIA-2 termofilik memberikan aktivitas enzim tertinggi pada suhu 55°C.

Johnvesly dan Naik (2001), melaporkan bahwa *Bacillus* sp. JB99 dapat tumbuh dan menghasilkan protease alkali pada rentang suhu yang luas antara 30–60°C dengan protease maksimum dihasilkan pada suhu optimum 55°C. Peningkatan suhu yang melebihi suhu optimum menyebabkan lemahnya ikatan didalam enzim. Pada suhu maksimum enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus non polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka keluar, kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun, sehingga aktivitas enzim juga akan turun (Lehninger, 1982).

Adinarayana *et al.*, (2003) melaporkan aktivitas optimum protease *Bacillus* sp. 31 menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu 60°C karena asal isolat *Bacillus* sp. 31 berasal dari Sumber air panas Maribaya yang mempunyai suhu tinggi. Berbeda dengan penelitian lainnya menyatakan alkalin protease dari *B. subtilis* PE-11, *Bacillus* sp. APR-4 (Nakanisi *et al.*, 2008) dan *Bacillus* sp. B21-2 yang mempunyai aktivitas optimum pada suhu 60°C. Alkalin protease dari *B. stearothermophilus* AP-4 aktivitas optimumnya terjadi pada suhu 55°C (Vidyasagar *et al.*, 1994). Menurut Glazer dan Nikaido (1995) jenis mikroorganisme yang berbeda sering menghasilkan enzim

yang sama reaksi katalitiknya, tetapi menghasilkan aktivitas yang berbeda.

Aktivitas enzim yang berbeda kemungkinan disebabkan jumlah enzim dan sekuen asam amino yang dihasilkan. Menurut Suhartono (1991) aktivitas protease dari mikroorganisme dipengaruhi oleh jumlah enzim dan sekuen asam amino dari enzim yang dihasilkan. Naiola dan Widhyastuti (2007) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. mampu menghasilkan protease pada rentang aktivitas suhu 37°C - 65°C, laju reaksi katalitik optimum pada suhu 55°C dan penurunan laju reaksi enzimatis terjadi pada suhu diatas suhu 55°C. Hal ini disebabkan enzim mengalami denaturasi sehingga terjadi perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim. Sedangkan pada suhu inkubasi yang sangat rendah dapat mengakibatkan kecilnya energi kinetik yang dihasilkan sehingga bisa menurunkan intensitas antara enzim dan substrat.



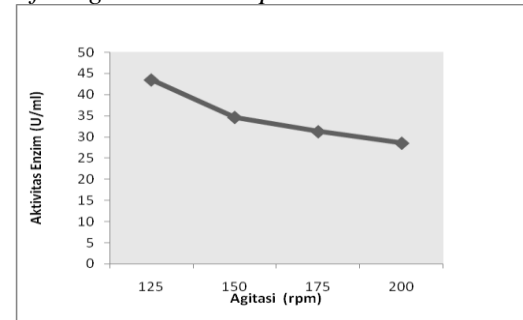
Gambar 2. Efek pH medium terhadap produksi protease.

Gambar 2 menunjukkan bahwa produksi protease menghasilkan enzim pada rentang pH 7,5 sampai dengan pH 9,0 dengan pH medium optimum pH 7,5 dengan aktivitas protease 27,17 U/ml. Widhyastuti (2007) melaporkan bahwa *Bacillus licheniformis*, *B. coagulans* dan *B. stearoformis* memiliki aktivitas protease pada pH 7,5. Trismilah dan Sumaryanto (1997) juga melaporkan *B. megaterium* DSM 319 memiliki aktivitas protease pada pH 7,5. Protease bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki pH yang sama dengan isolat T1S1 dan T3S2 yaitu pada pH 8 (Baehaki *et al.*, 2008). Naiola dan

Widhyastuti (2007) menjelaskan bahwa peningkatan dan penurunan aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor di antaranya kondisi suhu dan pH. pH juga berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat.

Menurut Lehninger (1982) pH sangat mempengaruhi reaksi enzimatik dimana perubahan pH berakibat langsung terhadap gugus-gugus ionik enzim, sehingga mempengaruhi aktif enzim dan konformasi enzim. Selain itu perubahan pH terlalu besar diatas pH optimum menyebabkan denaturasi enzim. (Winarno, 1995) menyatakan bahwa enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran yang disebut pH optimum yang umumnya antara pH 4,5 – 8.

#### Efek agitasi terhadap isolat bakteri M1-23



Gambar 3. Efek agitasi terhadap produksi protease

Gambar 3 menunjukkan bahwa setiap perlakuan memperlihatkan rata-rata produksi protease yang berbeda nyata satu sama lainnya, yaitu pada perlakuan 125 rpm menunjukkan rata-rata produksi protease paling tinggi dan 200 rpm menunjukkan rata-rata produksi protease paling rendah. Seperti halnya suhu dan pH, agitasi juga berpengaruh terhadap aktivitas produksi protease. Penurunan oksigen menyebabkan penurunan dalam laju pertumbuhan sel-sel di dalam media fermentasi, sehingga produksi enzim juga menurun. Proses fermentasi secara umum adalah aerobik, sehingga membutuhkan oksigen. Jika dilakukan pengocokan lebih

tinggi maka akan menyebabkan banyak terdapat buih, dan menyebabkan kekurangan oksigen. Hal ini sama dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Nasrazuhdy (2013) yaitu produksi protease bakteri proteotermofilik menunjukkan aktivitas paling tinggi pada agitasi 125 rpm.

Penelitian Agustien (2010) menunjukkan produksi protease alkali dan keratinase dari *Brevibacillus agri* A-03 dihasilkan pada agitasi 150 rpm. Dari hasil yang didapatkan semakin besar agitasi yang diberikan maka semakin kecil produksi protease yang dihasilkan. Gambar 3 juga menunjukkan bahwa semakin cepat pengocokan, maka semakin rendah produksi enzim. Hal ini disebabkan kecepatan pengocokan media produksi enzim mengakibatkan terbentuknya buih sehingga bakteri tidak maksimum menghasilkan enzim.

Menurut Kumar dan Takagi (1999) agitasi merupakan faktor yang penting dalam menghasilkan enzim, karena agitasi akan berpengaruh terhadap homogenitas nutrisi, kultur dan penyediaan oksigen pada medium. Menurut Stanbury dan Whittaker (1984) buih yang ditimbulkan pada medium akibat agitasi yang tinggi dapat menyebabkan penurunan aktivitas dalam menghasilkan enzim. Menurut Utarti *et al.*, (2009) agitasi bertujuan untuk mempertahankan homogenitas campuran media, oksigen, dan kultur mikroorganisme serta mempercepat proses pencampuran dan pelarutan.

### Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan tentang pengaruh faktor abiotik terhadap isolat bakteri M1- 23 penghasil protease alkali dapat disimpulkan bahwa :

Suhu inkubasi dan pH optimum dalam produksi protease dari isolat bakteri M1- 23 yaitu pada suhu 55<sup>0</sup>C dan pH 7,5. Agitasi terbaik dalam produksi protease dari isolat bakteri M1-23 yaitu pada agitasi 125 rpm. Adanya interaksi antara suhu dan pH yaitu pada suhu 55<sup>0</sup>C dan pH 7,5.

### Daftar Pustaka

- Adinarayana, K., P. Ellaiah and D. S. Prasad. 2003. Production and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharmacy Science Technology*.4:56-64.
- Agustien, A. 2009. *Isolasi, Optimisasi dan Amobilisasi Brevibacillus agri A-03 dari Sumber Air Panas Sumatera Barat Penghasil Protease Alkali dan Keratinase Termotabil Serta Aplikasinya*. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Padjadjaran Bandung.
- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD PRESS: Bogor
- Akdiya, A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil enzim Protease Alkalin Termotabil*. Balai Penelitian Bioteknologi and Sumber Genetik Pertanian. Bogor
- Baehaki A, Suhartono MT. dan Nurhayati T. 2004. Karakterisasi Protease dari bakteri patogen ikan *Aeromonas hydrophilla*. Buletin Teknologi Hasil Perikanan.
- Brock, T. D. 1986. *Introduction : An overview of the Thermophiles*,: General, Molecular and Applied Microbiology Ed. T. D. Brock, A Wiley Inter science publication, John Wiley and Sons, New York
- El-Refai, H.A., M.A. Abdelnaby, A. Gabala, M.H. El-Araby and A.F.A. Fattah. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40, 2325-2332
- Enggel, J., A. Meryandini dan L. Natalia. 2004. Karakterisasi Protease Ekstraseluler *Clostridium bifermentans* R14-1-b. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 9 ,(1): 9-12
- Falch, E. A. 1991. Industrial enzymes-developments in production and application, *Biotechnology Advances* 9:643-658

- Fuad, A.M., R. Rahmawati dan N.R. Mubarik. 2004. Produksi dan karakterisasi persial protease alkali termostabil *Bacillus thermoglusidasius* AF-01. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 9, (1) : 29-35. Bogor
- Glazer, A.N. and H. Nikaido. 1995. Microbial enzyme in : Microbial Technology, *Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company. New York
- Johnvesly, B and G.R. Naik (2001). Study on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB99 in a chemically defined medium. *Journal process Biochemistry*, 37, 139-144
- Kumar, C.G and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advance*, 17, 561-594
- Kurniawan, H. M. 2011. *Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termoproteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Jambi*. Tesis Pasca Sarjana Biologi. Universitas Andalas : Padang
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar – Dasar Biokimia Jilid I*. Terjemahan Maggy Thenawidjaja. Erlangga : Jakarta
- Moat, G, A. and Foster, W, J. 1995. *Mikrobial Physiology*. Marshall University School of Medicine Huntington, West Virginia
- Naiola, E, dan N. Widhyastuti. 2007. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Protease dari beberapa Isolat Bakteri. *Berita Biologi*, 3, (6) : 467-473
- Nakanishi, T, N. Minamiura, and T. Yamamoto. 2008. *Agricultural Biological Chemistry*
- Nasrazuhdy. 2013. *Optimasi Ekstrinsik Parsial Bakteri Proteotermofilik Asal Sumber Air Panas Sungai Medang Jambi*. Tesis Pasca Sarjana Biologi. Universitas Andalas : Padang
- Pelczar, M. J., dan E. C. S. Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Diterjemahkan oleh Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka. Universitas Indonesia. Jakarta
- Rao, M.B., A.M, Tanksale, M.S. Gahtge and V.V. Despande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology Biology Review*, 62: 597- 635
- Stanbury, P.F. and A. Whittaker. 1984. *Principles of Fermentation Technology* Pergamon Press, Oxford
- Suhartono, M. T. 1991. *Protease*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor
- Trismilah dan Sumaryanto. 1997. *Pengaruh Kadar Nitrogen dalam Media pada Pembuatan Protease menggunakan Bacillus megaterium DSM 319*. Thesis Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
- Utarti, E., L. Nurita dan S. Arimurti. 2009. Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus* sp. 31. *Jurnal Ilmu Dasar*, 10, (1) : 102 – 108
- Vidyasagar M, Prokash S, Mahajan V, Shouche YS. and Screermulu K. 1994. Purification and Characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp TVSP101. *Braz. J. Microbiology*, 40, (1) : 101 – 104
- Wahyuntari, B. 2005. *Pemurnian dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler Isolat Prokariot Termofilik Ekstrim dari Tangkuban Perahu*. Disertasi. IPB : Bogor
- Walstra, P. J. T. M. Wouters. and T. J. Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology* 2nd Edition. Taylor and Francis Group. Boca Raton. New York
- Widhyastuti, N. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease *Bacillus* Sp. Berk. Penel. Hayati, 13 : 51-56
- Winarno, F.G. 1995. *Biokimia Pangan*. Gramedia Utama: Jakarta.