

Optimasi Parsial Isolat Termofilik M5-24 dalam Produksi Protease

Partial Optimization of Thermophilic Isolate M5-24 on Protease Production

Aghni Aznia^{*)}, Anthoni Agustien, dan Nasril Nasir

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

^{*)}Koresponden : aghniaznia@yahoo.com

Abstract

Research about partial optimization of thermophilic bacteria isolate M5-24 on protease production was conducted from May 2013 to December 2013 in Laboratory of Microbiology, Biology Department, Andalas University, Padang. Purpose of the research was to find out optimum condition of protease production by isolate M5-24. This study consisted of three steps. Step 1: Investigating the effect of temperature and pH used completely randomized design in factorial with two replications. The first factor was temperature (45⁰C, 50⁰C, 55⁰C, 60⁰C), the second factor was pH (7, 8, 9, 10). Step 2: Investigating the effect of inoculum doses and inducers used completely randomized design in factorial with three replications. The first factor was inoculum doses (1%, 5%, 10%) and the second factor was inducer (*yeast extract* 0,5%; *pepton* 0,1%; *kasein* 1%; *meat extract* 0,5%). While Step 3: Investigating the effect of agitation (125 rpm, 150 rpm, 175 rpm, 200 rpm) used completely randomized design with six replications. The result showed that the best duration of growing was at 18th hours after incubation, the highest enzyme activity was at temperature 50⁰ C; medium's pH at 8; the best of inoculum dose was at 5%; the best inducer was casein 1% and optimum agitation was at 175 rpm. Extrinsic optimization can increase protease production of thermophilic isolate M5-24 up to 1.7 times.

Keywords : Optimization, Protease, thermophilic, bacteria

Pendahuluan

Protease adalah salah satu enzim yang memiliki prospek paling baik untuk dikembangkan karena dipandang cukup luas aplikasinya dalam berbagai industri, baik pangan maupun non pangan. Protease merupakan satu dari tiga kelompok enzim terbesar dari industri enzim dan diperkirakan sebesar 60% dari total enzim yang diperjual-belikan di seluruh dunia. Perdagangan enzim industri dan 25% diantaranya bersifat termostabil. Protease telah dimanfaatkan antara lain dalam industri: detergen, pangan, farmasi dan kulit (Rao *et al.*, 1998).

Saat ini sebagian besar enzim yang digunakan dalam industri di Indonesia masih diimpor. Keadaan ini tentunya sangat merugikan jika ditinjau secara ekonomi, padahal Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan sumber alam hayati,

terutama mikroba penghasil enzim, termasuk protease (Wardani dan Nindita, 2012). Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor enzim tersebut perlu adanya usaha untuk memproduksi enzim protease (Suhartono, 1989).

Untuk memproduksi enzim yang mempunyai aktivitas yang tinggi sehingga dapat digunakan dalam aplikasinya, maka haruslah dilakukan optimisasi pada mikroba (Rakshit dan Haki, 2003). Salah satu isolat yang memiliki kemampuan menghasilkan protease adalah isolat M5-24. Isolat M5-24 merupakan isolat yang diisolasi dari sumber air panas Sungai Medang Jambi pada kolam kelima, titik kedua, merupakan isolat nomor 4 dengan memiliki habitat dengan kondisi lingkungan 74⁰C dengan pH 8,5. Isolat M5-24 mampu menghasikkan protease dengan memiliki indeks proteolitik 4,015 mm dan aktivitas protease sebesar 4,472 U/ml.

(Wahyuna, 2012).

Produktivitas awal protease isolat M5-24 masih dapat ditingkatkan apabila diketahui kondisi optimum dari isolat tersebut dengan merekayasa faktor- faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya seperti suhu, pH, agitasi, induser, dan dosis inokulum (Agustien, 2010). Oleh sebab itu dilakukan penelitian Optimasi parsial isolat M5-24 untuk mengetahui kondisi optimum isolat M5-24 dalam memproduksi protease.

Metode Penelitian

Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah metoda eksperimen rancangan acak lengkap (RAL) dalam beberapa tahapan.

Sumber Isolat yang digunakan

Isolat bakteri yang digunakan adalah isolat bakteri termofilik M5-24 yang diisolasi dari sumber air panas Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi

Uji pengaruh suhu inkubasi dan pH medium

Pada tahap pertama dilakukan perlakuan pengaruh suhu dan pH medium terhadap aktivitas enzim protease isolat termofilik M5-24 menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam faktorial (4x4). Faktor pertama adalah suhu inkubasi (A) terdiri dari empat suhu inkubasi (45°C, 50°C, 55°C, 60°C), faktor kedua adalah pH medium (pH 7, 8, 9, 10). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali sehingga diperoleh 32 unit percobaan.

Uji pengaruh dosis inokulum dan induser

Setelah didapatkan suhu dan pH optimum dari penelitian tahap 1 selanjutnya dilakukan percobaan pengaruh dosis inokulum dan induser terhadap aktivitas enzim protease isolat termofilik M5-24. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam Faktorial (3 x 4) dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah dosis inokulum (A) terdiri dari dosis inokulum 1%, 5%, 10%, faktor kedua induser (B) yaitu *yeast extract* 0,5%, pepton 0,1%, kasein 1%, *meat extract* 0,5%). Masing- masing perlakuan diulang

sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 36 unit percobaan.

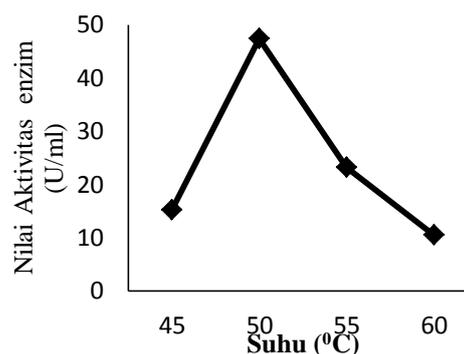
Uji pengaruh Agitasi terhadap Aktivitas Enzim

Setelah didapatkan dosis inokulum dan induser terbaik, pada tahap berikutnya dilakukan perlakuan pengaruh agitasi terhadap aktivitas enzim protease isolat M5-24 menggunakan Rancangan Acak Lengkap 4 perlakuan yaitu 125 rpm, 150 rpm, 175 rpm, dan 200 rpm dengan 6 ulangan sehingga diperoleh 24 unit percobaan.

Hasil dan Pembahasan

Uji pengaruh suhu inkubasi dan pH medium

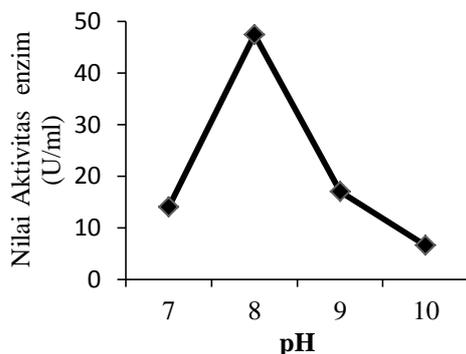
Hasil pengujian efek suhu inkubasi terhadap produksi protease dari isolat bakteri menunjukkan bahwa isolat M5-24 mampu tumbuh dengan rentang suhu yang luas antara 45- 60°C. Hal tersebut menandakan bahwasanya isolat M5-24 bersifat termofilik yang mampu menghasilkan enzim termostabil. Mikroorganisme termofilik merupakan mikroorganisme yang mampu hidup diatas suhu 45°C (Madigan, *et al.*, 2000). Efek suhu dan pH medium terhadap produksi protease lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Grafik aktivitas protease isolat M5-24 pada suhu berbeda

Gambar 1 memperlihatkan bahwa. Pada suhu 50°C didapatkan nilai aktivitas protease yang paling tinggi dan diatas suhu 50°C terjadi penurunan nilai aktivitas enzim. Hal ini dapat diartikan bahwa

produksi protease isolat M5-24 optimum pada suhu 50°C.



Gambar 2. Grafik aktivitas protease isolat M5-24 pada pH berbeda

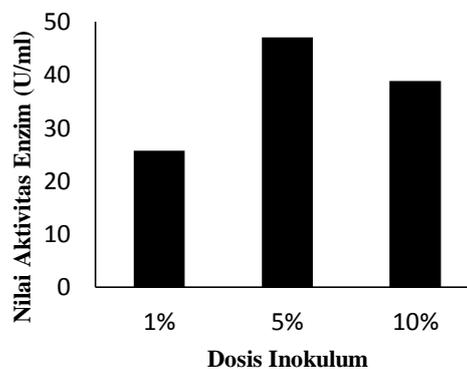
Pengujian efek pH medium terhadap produksi protease menunjukkan nilai aktivitas protease tertinggi yakni pada pH 8 dan nilai rata-rata aktivitas enzim protease terendah pada pH 10. Gambar 2 memperlihatkan bahwa aktivitas produksi protease meningkat dengan semakin meningkatnya nilai pH dan setelah tercapai pH optimum laju katalitik enzim mengalami penurunan. Laju reaksi optimum pada pH 8 dan mengalami penurunan pada pH 9 dan 10. Protease yang dihasilkan mikroorganisme memiliki aktivitas optimum pada kisaran pH 8-12 (Singh *et al.*, 2001).

Oleh karena perlakuan suhu 50°C dan pH 8 menunjukkan nilai aktivitas protease paling tinggi berarti kombinasi perlakuan paling optimum pengaruh suhu dan pH yakni pada suhu 50°C dan pH 8. Hal yang sama dilaporkan Razak *et al.* (1997) suhu dan pH optimum dalam produksi protease ekstraselular dari isolat *Bacillus* sp. (No.1) adalah pada suhu 50°C dan pH 8. Hal ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Agustien (2010), suhu dan pH optimum dari isolat *Brevibacillus agri* A-03 adalah suhu 55°C dan pH 9. Perbedaan kondisi optimum suhu dan pH terhadap aktivitas enzim dapat disebabkan karena strain bakteri yang digunakan berbeda, sebagaimana dijelaskan Kumar dan Takagi (1999), bahwa *Bacillus* sp. yang spesiesnya berbeda akan menghasilkan aktivitas enzim yang berbeda pula. Agustien (2010), menjelaskan bahwa aktivitas enzim yang

berbeda dari isolat *Bacillus* sp. bisa disebabkan karena jumlah enzim dan urutan asam amino protein enzim yang dihasilkan masing-masing isolat *Bacillus* sp. berbeda satu sama lainnya.

Uji pengaruh dosis inokulum dan induser

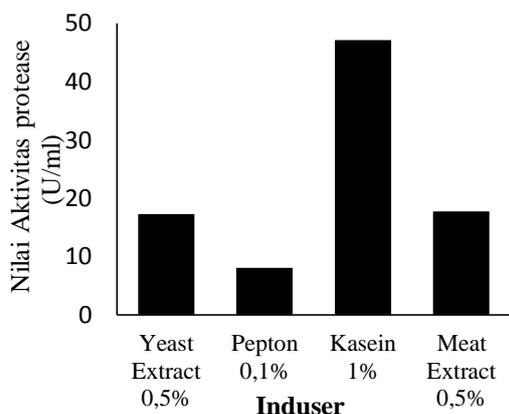
Hasil pengujian pengaruh dosis inokulum terhadap aktivitas protease isolat M5-24 dengan menggunakan kondisi optimum dari tahap sebelumnya yakni suhu 50°C, pH 8 menunjukkan bahwa nilai aktivitas protease tertinggi yakni pada dosis inokulum 5% dan nilai aktivitas protease terendah pada dosis inokulum 1%. Efek dosis inokulum terhadap produksi protease lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik aktivitas protease isolat M5-24 pada dosis inokulum berbeda

Gambar 3 menunjukkan bahwa dosis inokulum yang digunakan dapat mempengaruhi nilai aktivitas protease. Dosis inokulum 5% merupakan dosis inokulum yang paling optimum untuk menghasilkan protease. Sedangkan penggunaan dosis yang lebih kecil, yaitu 1% dapat menurunkan nilai aktivitas protease. Menurut Shafee *et al.* (2005), jika digunakan dosis yang lebih kecil dari dosis inokulum optimumnya dapat menyebabkan jumlah enzim yang disekresikan berkurang. Pada dosis yang lebih besar (10%) dari dosis inokulum optimum juga dapat menurunkan nilai aktivitas enzim. Rahman *et al.* (2003), menyatakan bahwa inokulum yang terlalu tinggi dosisnya dapat menyebabkan berkurangnya oksigen terlarut dan meningkatkan kompetisi terhadap nutrisi yang tersedia di medium.

Perez (1999), menyatakan kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada tinggi rendahnya dosis inokulum. Kecepatan reaksi bertambah seiring dengan bertambahnya dosis enzim hingga batas tertentu.



Gambar 4. Grafik aktivitas protease isolat M5-24 pada induser berbeda

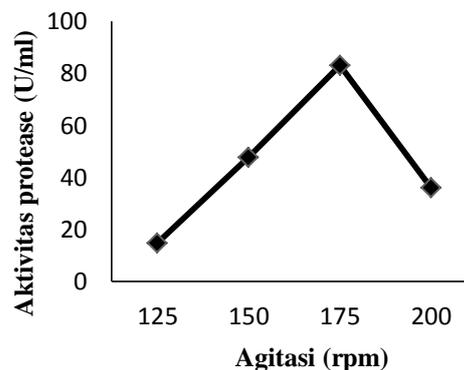
Gambar 4 terlihat bahwa kondisi optimal dalam memproduksi berbagai jenis enzim dapat dicapai dengan menambahkan induser (Stanburry dan Whitaker, 1984). Pemberian induser kasein menghasilkan aktivitas enzim protease tertinggi yang berbeda dengan perlakuan induser lainnya. Berarti kasein merupakan induser yang cocok dalam menginduksi aktivitas protease pada isolat M5-24. Rahman *et al.* (2003) melaporkan bahwa kasein, pepton, *meat extract* merupakan induser yang menginduksi biosintesis protease pada *Bacillus sp.* Begitu pula menurut Suhartono (1991), yang melaporkan bahwa kasein, pepton dan ekstrak khamir dapat digunakan sebagai induser.

Berdasarkan Gambar 4 terlihat bahwa setiap induser memberikan pengaruh yang berbeda antara satu induser dengan induser yang lainnya sebagaimana Ahmed (2010), menyatakan bahwa tiap spesies bakteri mempunyai kecenderungan induser yang berbeda-beda dalam produksi protease. *Yeast extract* mengandung asam amino yang lengkap & vitamin (B kompleks) Pepton merupakan protein sederhana yang berasal dari protein daging (Agustien, 2010). *Meat extract* mengandung asam amino isoleusin, lisin,

arginin, prolin dan valin yang tinggi Konsentrasi asam amino yang bebas yang tinggi, keberadaan asam amino isoleusin dan prolin mempunyai efek menekan produksi protease (Sumantha *et al.*, 2006).

Uji pengaruh Agitasi terhadap Aktivitas Enzim

Hasil pengujian pengaruh agitasi terhadap aktivitas protease dengan menggunakan kondisi optimum dari tahap sebelumnya yakni suhu 50°C, pH 8, induser kasein 1% dan dosis inokulum 5% menunjukkan bahwa aktivitas protease tertinggi yaitu pada perlakuan agitasi 175 rpm dengan 82,92 U/ml. Agitasi merupakan faktor yang penting dalam penghasilan enzim, karena agitasi akan berpengaruh terhadap homogenitas nutrisi, kultur dan penyediaan oksigen pada medium (Kumar dan Takagi, 1999). Efek agitasi terhadap produksi protease lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik rata-rata nilai aktivitas protease pada agitasi berbeda

Gambar 5 menunjukkan bahwa kecepatan pengadukan di atas 175 rpm, yaitu pada agitasi 200 rpm memiliki aktivitas protease terendah karena pada media fermentasi terdapat busa cukup banyak. Busa dapat memberikan efek buruk, karena gelembung udara terkandung dalam busa sehingga oksigen di dalam medium juga berkurang. Penurunan oksigen yakni pada agitasi dibawah 175 rpm menunjukkan penurunan dimana Tarigan (1998), menyatakan bahwa kondisi menurunnya oksigen pada medium dapat menyebabkan penurunan dalam laju

pertumbuhan sel-sel di dalam media fermentasi, sehingga produksi enzim juga menurun. Proses fermentasi secara mayoritas adalah aerobik, sehingga membutuhkan terjadinya oksigen (Stanburry dan Whitaker, 1984). Pentingnya agitasi terutama untuk mensuplai kebutuhan oksigen bagi mikroba dalam melangsungkan metabolisme, sedangkan fungsi sekundernya ialah untuk mempertahankan mikroba tetap dalam suspensi media fermentasi (Soekopitojo, 1986).

Produksi Protease Alkali setelah Optimasi
Sebelum optimasi digunakan suhu 50⁰C, pH medium 8, dosis inokulum 5%, induser kasein 1% dan agitasi 150 rpm dengan medium Banarjee yang dimodifikasi sebagai medium produksi. Setelah dilakukan optimasi didapatkan hasil suhu optimum 50⁰C, pH optimum 8, dosis inokulum 5%, dan induser terbaik kasein 1% dalam produksi protease isolat M5-24. Nilai peningkatan aktivitas protease pada kondisi sebelum dan sesudah optimasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas protease pada kondisi sebelum dan setelah optimasi.

Kondisi	Aktivitas protease (U/ml)	Peningkatan aktivitas
Sebelum optimasi	47,38	1,75
Setelah optimasi	82,92	

Aktivitas protease alkali pada isolat M5-24 pada kondisi sebelum optimasi adalah 47,38 U/mL dan setelah dilakukan optimasi aktivitas protease alkali pada isolat M5-24 dengan adalah sebesar 82,92 U/mL dimana peningkatan aktivitas protease sangat signifikan pada tahapan ketiga yaitu faktor agitasi. Hal ini berarti optimasi ekstrinsik yang dilakukan terhadap isolat M5-24 meningkatkan produksi protease alkali sebesar 1,75 kali. Pada penelitian Rao *et al.* (2008), melaporkan bahwa produksi enzim dari *Bacillus circulans* meningkat sebesar 1,5 kali. Peningkatan nilai aktivitas protease dilaporkan bahwa optimasi medium produksi protease dari *Bacillus licheniformis* meningkatkan produksi enzim 10 kali dibandingkan dengan menggunakan medium basal (Mabrouk *et al.*, 1999).

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan tentang optimasi parsial isolat M5-24 maka dapat disimpulkan kondisi optimum isolat M5-24 dalam produksi protease yakni pada: suhu inkubasi optimum 50⁰C; pH 8; dosis inokulum 5%; induser kasein 1%; agitasi optimum 175 rpm. Optimasi ekstrinsik pada isolat M5-24 dapat meningkatkan aktivitas protease sampai 1,75 kali.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr. Zozy Aneloi Noli, Dr.phil.nat Nurmiati, dan Zuhri Syam, MP dan Dr. Henny Herwina banyak memberikan kritik dan saran dalam penelitian ini. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada DIKTI yang telah memberikan bantuan dana penelitian dalam Program Kreativitas Mahasiswa 2013.

Daftar Pustaka

- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. Universitas Padjajaran Press. Bandung
- Ahmed, I., M. Irfan, M. Nadeem, M.A. Zia, B.M. Ahmad, M. Hafiz and N. Iqbal. 2010. Optimization of Media and Environmental Conditions for Alkaline Protease Production Using *Bacillus subtilis* in Submerged Fermentation Process. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences* 4 (4): 105-113.
- Fuad, A.M., R. Rahmawati dan N.R. Mubarik. 2004. Produksi dan karakterisasi parsial protease alkali termostabil *Bacillus thermoglusidasius* AF-01. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 9 (1): 29-35.
- Kumar, C. G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases from a

- bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advance* 17: 561-594.
- Mabrouk, S.S., A.M. Hashem, N .M. A. El-Shayeb, A. M. S. Ismail and A. F. A. Fatah. 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology* 69: 155-159.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker. 2000. *Biology of Microorganisms*. 9th Ed. Prentice Hall International Inc. New Jersey.
- Mubarik, N. R. 2001. *Pemurnian dan Karakterisasi Protease ekstraseluler dari isolat bakteri termofilik GP-04*. Disertasi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Perez, A. M. 1999. Thermostability of powder enzymes: in vitro recoveries and in vivo efficacies. *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium*.
- Rahman R. N. Z. R. A., M. Basri, and A. B. Salleh. 2003. Thermostable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1; nutritional factors affecting protease production. *Annals of Microbiology* 53: 199-210.
- Rakshit, S. K. and G. D. Haki. 2003. Development in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89: 17-34.
- Rao, C. S., S. S. Madhavendra, R. R. Sreenivas, P. J. Hobbs and R. S. Prakasham. 2008. Studies on improving the immobilized bead reusability and alkaline protease production by isolated immobilized *Bacillus circulans* (MTCC6811) using overall evaluation criteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 150 (1): 65-83.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, S. G. Mohini dan V. V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 597- 635.
- Razak, C. N. A., S. W. Tang., M. Basri., and A. B. Salleh. 1997. Preliminary Study on the Production of Extracellular Protease from a Newly Isolated *Bacillus* sp. (No.1) and the Physical Factors Mfecting Its Production. *Pertanika Journal of Science and Technology* 5 (2): 169-177.
- Shafee, N., S. N. Aris, R. N. Z. A. Rahman, M. Basri and A. B. Saleh., 2005. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strains 146. *Journal of Applied Sciences Research*. 1(1): 1-8.
- Singh, J., N. Batra, and R. C. Sobti. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. *Process Biochemistry*. 36: 781-785.
- Soekopitojo, S. 1986. *Pengaruh Inducer dan Kecepatan Agitasi terhadap produksi Amiloglukosidase dari Aspergillus niger L 51/NRRL A-11, 264*. Skripsi Sarjana Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Stanbury, P. F. and A. Whitaker. 1984. *Principle of Fermentation Technology*. Pergamon Press. . New York
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Suhartono, M. T. 1991. *Protease*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Sumantha, A., C. Larroche, and A. Pandey. 2006. Microbiology and industrial of food-grade protease : A perspective. *Food. Technology, Biotechnology*, 44, 2, 211-220
- Tarigan. 1998. *Pengantar Mikrobiologi*. Departemen Pendidikan. Yogyakarta.
- Wahyuna, D. 2012. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termo-proteolitik Sumber Air Panas Sungai Medang, Sungai Penuh, Jambi*. Skripsi Sarjana Biologi Universitas Andalas (Unpublished).
- Wardani A. K. dan L. O. Nindita. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Hasil Isolasi dari Whey Tahu. *Jurnal Teknologi Pertanian* 13 (3): 149- 156.