

AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DARI *Mucorjavanicus* YANG DITUMBUHKAN
PADA MEDIA TEPUNG SINGKONG (*Mannihot utilisima*)¹
[The Activity of Protease Enzyme from *Mucor javanicus* Grow
in Cassava Flour Media]

Abdul Choliq

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
Jl. Raya Jakarta-Bogor KM46 Cibinong 16911 Tel. (021) 8765066

ABSTRACT

The experiment was conducted to study the activity of protease from *Mucorjavanicus* in cassava flour media. The influence of peptone and incubation time to the production of the enzyme, and the influence of pH and temperature to the activity of protease were studied. The production of protease was conducted in the flask (100 ml) which contain 17.5 g cassava flour and 50 ml aqueous media. The species of *M. javanicus* observed consist of 10 strains. The strain of *M. javanicus* which has the highest production of protease among the tenth was incubated in cassava flour media with 3 variations of incubation time (4, 7 and 10 days) and 5 variations of peptone concentration (1-5%). The pH and temperature used for protease characterization were pH 4.0-7.0 and 30-70°C, respectively. The results show that the highest protease production with the optimal incubation period 7 days (0.51 U/ml) was *M. javanicus* M3. The optimal concentration of peptone for protease production was 2 %. The optimal protease activity was reached in pH 5 and temperature 50°C with the value of 4.53 U/ml.

Kata kunci: Protease, *Mucor javanicus*, tepung singkong, *Manihot esculenta*.

PENDAHULUAN

Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan peptida pada protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Protease dibagi menjadi protease serin, protease tiol, protease aspartat dan protease logam. Dewasa ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri (Kamelia *et al.*, 2005).

Kesadaran masyarakat terhadap masalah lingkungan yang semakin tinggi serta adanya tekanan dari para ahli dan pecinta lingkungan, menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri (Falch, 1991). Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak beracun (Aunstrup *et al.*, 1979). Protease merupakan enzim penting dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena aplikasinya yang sangat luas. Industri pengguna protease di antaranya ialah industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, makanan, bir, dan limbah (Moon dan Parulekar, 1993). Oleh karena itu, tidak mengherankan apabila protease yang digunakan mencapai 60% dari total enzim yang diperjualbelikan di seluruh dunia (Ward, 1985).

Berbagai jenis bakteri dan kapang dilaporkan mampu menghasilkan protease (*Bacillus amylolique*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. thermoproteolyticus*, *Mucor pucillus*, *M. miehei*, *Aspergillus oryzae*, *A. sojae* dan *A. phoenicis*), beberapa di antaranya telah digunakan dalam skala industri (Saono dan Basuki, 1978). Kapang *M. javanicus* mempunyai daya proteolitik yang kuat, sehingga dimungkinkan untuk dikembangkan sebagai salah satu kapang penghasil protease (Saono dan Basuki, 1978).

Kendala utama penggunaan mikroba sebagai penghasil enzim dalam skala industri adalah tingginya biaya produksi yang diperlukan, karena terlalu rendahnya aktivitas protease yang didapatkan. Dengan pemilihan biak-biak terseleksi dan pemanfaatan komoditi pertanian yang murah, tersedia dalam jumlah yang berlimpah dan cocok untuk media pertumbuhan mikroba diharapkan dapat mengatasi kendala tersebut. Penelitian sebelumnya telah mengungkapkan bahwa tepung tapioka (ketela pohon) merupakan media yang baik untuk pertumbuhan kapang (Pangloli dan Satari, 1985). Mengingat bahan ini banyak diperoleh di Indonesia dengan harga yang murah untuk dikembangkan sebagai media dalam produksi enzim protease, maka dengan sedikit penambahan sumber nitrogen yang diperlukan diharapkan dapat mempertinggi rendemen protease yang dihasilkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengukur aktivitas protease *M. javanicus* yang ditumbuhkan pada media tepung singkong (*Mannihot utilissima*) dengan penambahan pepton sebagai sumber nitrogen. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease juga diamati.

BAHANDANMETODA

Mikroorganisme

Sepuluh strain *M. javanicus* (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong. Singkong yang digunakan diperoleh dari daerah di sekitar Bogor.

Metode analisis data yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan uji Scheffe dalam 3 kali ulangan untuk setiap perlakuan dengan parameter aktivitas protease dalam U/mL.

Preparasi Inokulum

Suspensi spora kapang *M. javanicus* digunakan sebagai inokulum. Kapang ditumbuhkan pada media tauge agar, diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar. Suspensi spora dibuat dengan menambahkan aquades steril, diukur kerapatan optiknya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm sampai kepekatan optik 0,5. Untuk setiap 10 g media digunakan 0,9 ml suspensi kapang tersebut.

Uji kualitatif Aktivitas Proteolitik.

Pengujian aktivitas proteolitik secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan kapang *M. javanicus* pada cawan petri yang berisi 15 ml media uji dengan komposisi: KCl 0,5 g, MgSO₄ 0,5 g, Fe SO₄ 0,01 g, KH₂PO₄ 1,0 g, C₆H₁₂O₆ 10 g, susu skim 7,0 g dan agar bakto 15 g dalam 1L akuades. Aktivitas proteolitik ditandai dengan terbentuknya lingkaran bening di sekitar koloni kapang.

Produksi Enzim Protease.

Produksi enzim protease dilakukan dalam erlenmeyer (100 ml) yang berisi 17,5 gr tepung singkong dalam 50 ml akuades. Strain *M. javanicus* dengan aktivitas proteolitik tertinggi diinokulasikan pada media tepung singkong dengan 3 variasi masa inkubasi (4, 7, 10 dan hari). Pengaruh penambahan pepton terhadap aktivitas enzim protease dilakukan dengan 5

macam konsentrasi (1, 2, 3, 4 dan 5%) dengan masa inkubasi 7 hari. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease yang dihasilkan dilakukan terhadap ekstrak enzim yang diperoleh pada masa inkubasi 7 hari dan penambahan pepton 2% dengan 5 variasi pH (4,5,6,7 dan 8) dan 5 variasi suhu (30,40,50,60 dan 70°C).

Ekstraksi Enzim Protease.

Kultur padat yang telah dipenuhi miselium masing-masing perlakuan ditambah air suling sebanyak 5 kali berat tepung singkong yang digunakan, dikocok selama dua jam dalam "ice bath". Campuran tersebut disentrifugasi dengan "continuous refrigerated centrifugation" pada 2500 rpm selama 15 menit. Bagian cairan ditambah larutan CaCl₂ 20% dengan perbandingan 1 mL larutan kalsium diklorida untuk setiap 30 mL bagian cairan yang diperoleh, dibiarkan selama 1 jam lalu disentrifugasi pada 2500 rpm selama 15 menit. Larutan enzim yang diperoleh disimpan pada suhu 0°C untuk ditetapkan aktivitasnya.

Penentuan Aktivitas Protease

Penentuan aktivitas protease ekstrak enzim yang diperoleh dilakukan menurut cara Bergmeyer (1983). Sebanyak 1 mL larutan 2% kasein dicampur dengan 1 mL buffer borat (0,01 M pH 8,0), 0,20 ml asam klorida 0,05 M dan 0,20 mL ekstrak enzim protease yang akan ditetapkan aktivitasnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, ditambah 2 mL asam trikloroasetat 0,1 M, dibiarkan pada suhu 37°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi. Bagian filtrat 1,5 mL dicampur dengan 5 mL dinatrium karbonat 0,5 M dan 1 ml pereaksi Folin Ciocalteu's, dibiarkan 20 menit pada 37°C, lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm. Untuk penetapan blanko, larutan enzim diganti dengan air suling dan untuk penetapan standar, larutan enzim diganti dengan standar tirosin (5 mmol/mL). Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim.

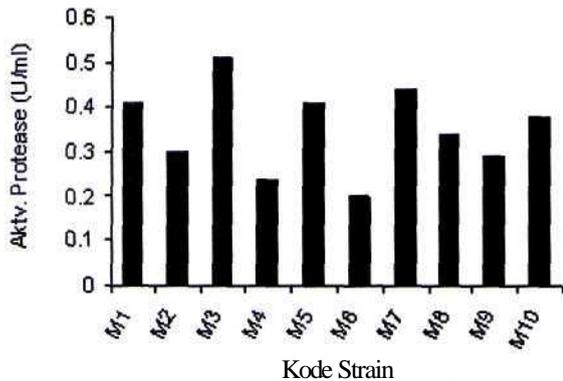
HASIL

Hasil pengujian terhadap sepuluh strain *M. javanicus* yang ditumbuhkan pada media agar yang mengandung susu skim memperlihatkan adanya zona bening di sekitar koloni kapang. Selanjutnya kesepuluh strain tersebut ditumbuhkan dalam media cair yang

$$U = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times P \times \frac{1}{T}$$

- U = Unit aktivitas protease per menit (Unit/ml)
- Asp = Nilai absorbansi contoh
- Ast = Nilai absorbansi standar
- Abl = Nilai absorbansi blanko
- P = Faktor pengenceran
- T = Waktu inkubasi enzim (menit).

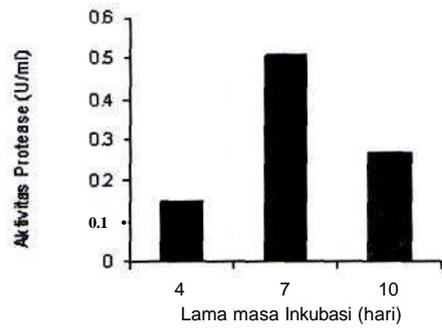
mengandung tepung singkong, diinkubasi selama 7 hari dengan pengocokan. Hasil pengujian aktivitas enzim memperlihatkan bahwa semua strain yang diuji menghasilkan protease (Gambar 1). Besarnya aktivitas protease yang dihasilkan strain-strain *M. javanicus* bervariasi, yaitu 0,20 - 0,51 U/mL. Protease tertinggi dihasilkan oleh strain *M. javanicus* (M3) dengan aktivitas sebesar (0,51 U/mL). Strain ini digunakan untuk penelitian selanjutnya, yaitu optimasi produksi protease. Perlakuan yang diteliti yaitu pengaruh waktu inkubasi dan penambahan pepton.



Gambar 1. Aktivitas protease 10 strain *M. javanicus*

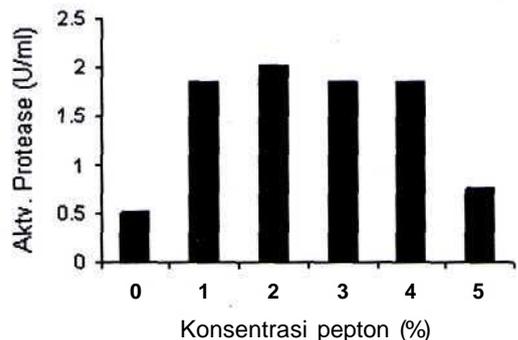
Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi protease diperlihatkan dalam Gambar 2. Produksi protease paling tinggi di peroleh pada masa inkubasi 7 hari, yaitu sebesar 0,51 U/mL. Hasil analisis statistik dengan taraf nyata 5% menunjukkan adanya perbedaan nyata dari ketiga perlakuan lama masa inkubasi. Selanjutnya uji Scheffe menunjukkan bahwa produksi protease *M. javanicus* M3 dengan 3 macam masa inkubasi berbeda satu sama lain.

Pengaruh penambahan pepton terhadap produksi protease dilakukan dengan masa inkubasi 7 hari dan hasilnya diperlihatkan dalam Gambar 3. Hasil



Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi protease

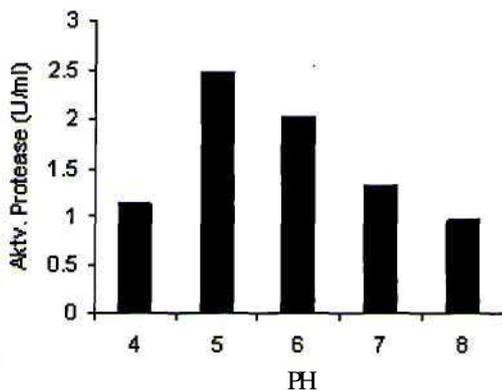
analisis statistik dengan taraf nyata 5% menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dari ke enam perlakuan penambahan pepton tersebut. Selanjutnya dengan uji Scheffe menunjukkan bahwa perlakuan penambahan peptone berbeda nyata terhadap kontrol (tanpa penambahan pepton). Aktivitas protease pada media dengan konsentrasi pepton 1% dan 3% tidak berbeda nyata, demikian juga 4% dan 5%. Aktivitas protease pada media yang ditambahkan 2% peptone berbeda nyata dengan semua perlakuan. Aktivitas protease tertinggi diperoleh pada media dengan konsentrasi pepton 2%.



Gambar 3. Pengaruh penambahan pepton terhadap produksi protease

Larutan enzim protease yang digunakan untuk karakterisasi enzim diekstraksi dari kultur cair yang diinkubasi selama 7 hari pada media yang mengandung peptone 2%. Karakter protease yang diteliti yaitu pengaruh derajat keasaman (pH) dan suhu. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease diperlihatkan dalam Gambar 4. Dari gambar tersebut diketahui bahwa aktivitas protease *M. javanicus* memiliki rentang **pH**

yang sempit dan reaksi enzimatisnya optimal pada pH 5,0, yaitu sebesar 2,47 U/mL. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dari ke lima macam perlakuan derajat keasaman yang digunakan. Uji Scheffe menunjukkan bahwa aktivitas protease pada pH 4 berbeda dengan pH 5 dan 6, tetapi tidak berbeda dengan pH 7 dan 8. Sedangkan aktivitas protease pada pH 4, 5 dan 6 masing-masing berbeda satu sama lain.



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease

Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap aktivitas protease dilakukan pada pH 5, hasil penelitian diperlihatkan pada gambar 5. Aktivitas enzim protease yang paling tinggi diperoleh pada suhu 50°C. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dari kelima perlakuan suhu, dan uji Scheffe mengungkapkan bahwa kelima macam suhu (30,40,50 60 dan 70°C) berbeda nyata satu sama lainnya. Pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa aktivitas protease meningkat sampai suhu 50°C dan setelah itu makin naik suhu makin turun aktivitas protease.

PEMBAHASAN

Aktivitas proteolitik kapang pada media agar yang mengandung susu skim diperlihatkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni kapang. Zona bening tersebut menunjukkan bahwa protein dalam susu skim telah terdegradasi oleh protease yang dihasilkan oleh kapang. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua strain *M. javanicus* yang diuji menghasilkan protease. Kapang dari genus *Mucor* diketahui menghasilkan protease dan beberapa jenis *Mucor* telah diaplikasikan dalam industri, misalnya

dalam industri keju (Alves *et al*, 2005). Perbedaan besarnya aktivitas protease pada tingkat jenis dan strain kapang tersebut kemungkinan terletak pada perbedaan variasi gen penyandi protease. Aktivitas protease terendah dihasilkan oleh *M. javanicus* M6 (0,20 U/mL) yang diisolasi dari oncom hitam berbahan baku bungkil kacang tanah dan aktivitas tertinggi dihasilkan oleh *M. javanicus* M3 (0,44 U/mL).

Produksi protease juga dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Menurut Alves *et al.* (2005) *Mucor* mulai mensintesa protease pada 24 jam inkubasi tetapi tingginya aktivitas protease tidak selalu dipengaruhi oleh konsentrasi biomassa dan fase pertumbuhannya. Aktivitas protease *M. javanicus* M3 tertinggi dicapai setelah 7 hari inkubasi. Beberapa jenis *Mucor* yang diteliti oleh Alves *et al.* (2005) menghasilkan protease tertinggi pada waktu inkubasi yang bervariasi, dari 1-5 hari. Variasi waktu inkubasi optimum terjadi juga pada tingkat strain.

Meningkatnya produksi protease pada media yang ditambahkan pepton memperlihatkan adanya induksi dalam sintesa enzim protease. Protease ekstraseluler termasuk enzim induktif yang sintesanya dipengaruhi oleh adanya induktor, seperti polipeptida dan asam-asam amino. Pepton merupakan salah satu jenis protein dengan komponen terbesar adalah phosphoglikoprotein yang memiliki berat molekul rendah sampai sedang. Mengingat bahwa senyawa yang memiliki berat molekul besar tidak dapat masuk ke dalam sel maka kemungkinan komponen pepton yang memiliki berat molekul rendah yang berfungsi sebagai induktor. Asam amino yang terkandung dalam pepton sebagian besar terdiri dari asam glutamat dan asam aspartat (asam amino yang bersifat asam) serta sebagian kecil methionin. Protease kapang pada umumnya termasuk dalam protease asam dimana kandungan asam amino yang menyusunnya lebih banyak tersusun dari asam amino yang bersifat asam dibandingkan asam amino yang bersifat basa (Suhartono, 1989). Hal ini dapat menjelaskan mengapa penambahan pepton pada media tepung singkong dapat meningkatkan sintesa protease *M. javanicus*. Aktivitas protease *M. javanicus* tinggi pada media yang ditambahkan pepton 2-4%. Penambahan pepton pada konsentrasi yang lebih tinggi mengakibatkan

produksi protease menurun. Menurut Ward (1983), ada efek represi oleh asam amino terhadap sintesis enzim ekstraseluler. Penghambatan ini terjadi pada membran sel pada taraf transkripsi, sehingga sintesis mRNA akan terhambat. Konsentrasi mRNA yang tinggi di dalam sel berkaitan langsung dengan sintesis enzim ekstraseluler. Asam amino yang berfungsi sebagai represor akan menurunkan jumlah mRNA, dan selanjutnya akan menyebabkan penurunan jumlah enzim ekstraseluler.

Derajat keasaman berpengaruh terhadap aktivitas protease *M. javanicus*. Perubahan aktivitas enzim karena pengaruh pH dapat disebabkan oleh perubahan muatan ion pada asam amino penyusun enzim itu sendiri dan atau perubahan ion substratnya. Perubahan kondisi ion enzim dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi katalitik mengikat substrat maupun pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kuaterner enzim yang aktif. Seperti pada umumnya protease yang dihasilkan oleh kapang (Winarno, 1985), protease *M. javanicus* M3 memiliki aktivitas optimal pada kondisi asam (pH 5,0) sehingga protease tersebut dapat digolongkan ke dalam protease asam.

Aktivitas protease *M. javanicus* M3 tertinggi dicapai pada suhu 50°C. Meningkatnya aktivitas enzim di bawah suhu optimalnya dikarenakan meningkatnya frekwensi tumbukan antara enzim dan substrat. Sedangkan menurunnya aktivitas enzim di atas suhu optimal disebabkan oleh terputusnya ikatan-ikatan sekunder enzim. Putusnya ikatan sekunder yang mempertahankan struktur enzim dalam keadaan katalitik aktif ini mengakibatkan hilangnya struktur sekunder dan tersier dari enzim yang disertai dengan berkurang atau hilangnya aktivitas enzimatis. Selain itu pada suhu yang tinggi substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam "memasuki" sisi aktif enzim (Harper *et al*, 1984; Suhartono, 1989).

KESIMPULAN

Diantara 10 strain *Mucor javanicus* yang diuji aktivitas proteasenya, *M. javanicus* M3 menghasilkan protease tertinggi, yaitu (0,51 U/mL). Aktivitas protease yang tinggi dihasilkan oleh *M. javanicus* dalam media

tepung singkong dengan penambahan peptone 2-4% dengan waktu inkubasi 7 hari. Aktivitas enzim protease *M. javanicus* M3 mencapai optimum pada pH 5 dan suhu 50°C dengan nilai sebesar 4,53 U/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Alves MH, GM Campos-Takaki, K Okada, IHF Pessoa and AI Milanez. 2005.** Detection of Extracellular Protease in *Mucor* Species. *Revista Iberoamericana de Micologia* 22,114-117.
- Aunstrup KO, O Andressen, EA Falch and TK Nielsen. 1979.** Production of microbial enzymes. In: *Microbial Technology*. Pepples and D Perlman (Eds), 1. Academic Press Inc. New York
- Bergmeyer HU. 1983.** *Method of Enzymatic Analysis* 2. Verlag Chemie. Weinstein.
- Falch EA. 1991.** Industrial enzymes developments in production and application. *Biotechnology Adv.* 9, 643-658.
- Harper HA, VW Rodwel and Mayer PA. 1984.** *Review of Physiological Chemistry*. Lange Medical Publication. California.
- Kamelia R, M Sindumarta dan D Natalia. 2005.** Isolasi dan karakterisasi protease intraselular termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. *Prosiding Seminar Nasional MIPA*. Universitas Indonesia Depok, 24-26 November.
- Moon SH and SJ Parulekar. 1993.** Some observation on protease producing in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 43-54.
- Pangloli P dan AM Satari. 1985.** Pengembangan teknologi satu untuk pengembangan industri rakyat menengah dan industri teknologi tinggi. *Majalah BPPT* 19, 1- 12.
- Saono S dan T Basuki. 1978.** The amylolytic, lipolytic and proteolytic activities of yeast and mycelial molds from ragi and some Indonesia traditional fermented foods. *Annales Bogorienses* 4, 207 - 219.
- Suhartono MT. 1989.** *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Ward OP. 1983.** Proteinase. In: *Microbial and Enzyme Biotechnology*. WM Fogarty (Ed.). Appl.Sci. Publ. New York.
- Ward OP. 1985.** Proteolytic enzymes. In: *Comprehensive Biotechnology: The principles, Applications, and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine* 3. MM Young (Ed.). Pergamon Press. Oxford.
- Winarno FG. 1985.** *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.