

Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp.

Yusriah dan Nengah Dwianita Kuswytasari

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111

E-mail: kuswytasari@bio.its.ac.id

Abstrak—Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease pada *Penicillium* sp.3 T₃f₂. Selanjutnya, isolat *Penicillium* sp. di kultur dalam media produksi protease untuk menghasilkan protease. Suhu yang digunakan adalah 30⁰ – 50⁰C sedangkan pH-nya 4 – 8. Aktivitas protease ditentukan dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 275 nm, dengan kasein sebagai substrat. Berdasarkan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95%, didapatkan bahwa hanya pH yang berpengaruh terhadap aktivitas protease. Aktivitas protease *Penicillium* sp. tertinggi sebesar 2.416 U/ml, dan dicapai pada pH 8 dan suhu 40⁰C.

Kata Kunci—aktivitas protease, *Penicillium*, pH, suhu.

I. PENDAHULUAN

Berbagai jenis bakteri dan kapang dilaporkan mampu menghasilkan protease dan beberapa diantaranya telah digunakan dalam skala industri. Protease merupakan enzim penting yang digunakan secara luas pada aplikasi industri dan merupakan 65% dari total penjualan enzim di dunia [1]. Protease digunakan pada beberapa industri seperti detergen, farmasi, produk-produk kulit, pengempukan daging, hidrolisat protein, produk-produk makanan, dan proses pengolahan limbah industri [2].

Sekitar dua pertiga protease yang digunakan di bidang industri dihasilkan oleh mikroorganisme, terutama bakteri dari genus *Bacillus* [3] dan kapang dari genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* [4] *Endhotia* dan *Mucor* [5]. Kebutuhan akan enzim protease di Indonesia cukup tinggi, namun kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap produksi impor tersebut adalah perlu adanya usaha untuk memproduksi enzim protease secara mandiri [6]. Mikroorganisme merupakan sumber enzim dan lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetika, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim [7].

Secara sederhana, protease merupakan enzim yang dapat menguraikan protein menjadi bentuk asam amino. Semakin

besar asam amino dihasilkan dari reaksi pemecahan protein tersebut maka dapat dikatakan bahwa protease tersebut memiliki aktivitas yang tinggi [7]. Seperti halnya enzim pada umumnya, maka aktivitas protease juga banyak dipengaruhi oleh berbagai faktor. Diantara faktor-faktor yang dominan pengaruhnya adalah suhu, pH, jenis substrat, serta aktivator dan inhibitor enzim.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease pada *Penicillium* sp. Isolat yang digunakan adalah isolat kapang tanah yang telah berhasil diisolasi dan dipurifikasi dari Wonorejo Surabaya yaitu *Penicillium* sp.3 T₃f₂. Isolat tersebut telah menjadi koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS. *Penicillium* sp. diharapkan mampu memiliki potensi dalam mendegradasi protein, sehingga nantinya dapat menjadi prospek dalam pengembangan agen hayati pendegradasi protein dan juga sebagai penghasil enzim protease yang penting dalam bidang pengolahan limbah berorientasi lingkungan serta industri.

II. METODE PENELITIAN

A. Peremajaan Isolat Kapang

Penicillium sp. disubkultur dalam media PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang mengandung 100 mg *Chloramphenicol*.

B. Pembuatan Kurva Standar Tirosin

Kurva standar tirosin dibuat dengan pengenceran dari larutan induk tirosin 3 mg/ml menjadi beberapa konsentrasi yaitu 0.15 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.45 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.9 mg/ml dan 1.2 mg/ml. Variasi tersebut dibuat dengan menggunakan larutan standar tirosin 3 mg/ml. Larutan diambil sebanyak 0.5; 1; 1.5; 2; 3; 4 ml lalu diencerkan dengan HCL 0.1 M hingga 10 ml. Selanjutnya masing-masing konsentrasi tersebut diukur absorbansinya pada 275 nm dengan spektrofotometer UV-Vis [7]. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan linearnya.

C. Preparasi Inokulum dan Enumerasi Spora Kapang

Kultur kapang yang berusia 120 jam dalam medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), ditambahkan 4 ml aquades steril ke dalamnya. Dilakukan pelepasan spora menggunakan jarum inokulasi. Kemudian tabung divortex untuk memisahkan gumpalan spora dan untuk mendapatkan suspensi yang homogen. Jumlah spora dihitung dengan *haemocytometer neubauer* untuk mendapatkan 10^6 spora/ml yang akan digunakan sebagai inokulum.

D. Produksi Enzim Protease

Sebanyak 2 ml dari suspensi spora (10^6 spora/ml) dari isolat *Penicillium* sp. diinokulasikan ke dalam media produksi enzim protease secara terpisah. Medium yang digunakan untuk memproduksi enzim protease adalah media larutan *Czapek* [8] dengan komposisi 2 gr NaNO_3 , 1 gr KH_2PO_4 , 0,5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 gr kasein dan 0,5 gr KCL dan ditambahkan 1 liter aquades.

Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 96 jam di *shaker inkubator*. Selanjutnya enzim yang telah di produksi dipisahkan antara filtrat dan supernatannya dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak enzim kasar yang selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas protease.

E. Uji Penentuan Aktivitas Protease

Pada metode ini kasein digunakan sebagai substrat. Sebanyak 3 ml kasein ditambahkan dengan 0,5 ml enzim dan diinkubasi sesuai dengan variasi suhu dan pH yang telah ditetapkan selama 10 menit. Variasi suhu yang ditetapkan adalah 30^0 , 35^0 , 40^0 , 45^0 dan 50^0C sedangkan variasi pH yang ditetapkan adalah 4, 5, 6, 7 dan 8. Reaksi dihentikan dengan penambahan larutan *Trichloro Acetic Acid* (TCA) sebanyak 3 ml. Kontrol yang digunakan adalah 3,5 ml kasein tanpa penambahan isolat dan diinkubasi selama 45 menit kemudian ditambahkan larutan *Trichloro Acetic Acid* (TCA) sebanyak 3 ml. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 275 nm. Aktivitas protease dihitung (1) dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim. Satu unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat [9].

$$Ae = \frac{x.V}{a.b} \quad (1)$$

di mana:

A = aktivitas enzim (mg/mL menit)

x^c = konsentrasi tirosin (mg/mL)

V = volume total sampel tiap tabung (mL)

a = volume enzim (mL)

b = waktu reaksi (menit)

F. Rancangan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu terhadap besarnya nilai aktivitas protease isolat kapang, digunakan

rancangan penelitian berupa rancangan acak lengkap (RAL). Data pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease dianalisis dengan menggunakan Analysis Of Variance (ANOVA) yang dilanjutkan oleh uji Duncan dengan tingkat kesalahan 5%.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Degradasi protein dapat terjadi salah satunya karena adanya aktivitas enzim protease. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan variasi suhu dan pH, untuk memperoleh suhu dan pH optimum. Asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein oleh protease, dipisahkan dari protein yang belum terhidrolisis menggunakan asam trikloroasetat (TCA). Asam amino dan peptida akan dilarutkan dengan TCA, sedangkan protein yang memiliki bobot molekul yang besar akan mengendap. TCA juga berfungsi menginaktifkan protease dan menghentikan waktu inkubasi protease. Tahap pemisahan asam amino dan peptida yang terbentuk selama inkubasi dengan protein yang mengendap atau dengan substrat yang belum terhidrolisis dibantu oleh sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk melalui tahap pemisahan tersebut merupakan asam amino hasil hidrolisis kasein oleh protease. Kemudian diukur absorbansinya pada 275 nm.

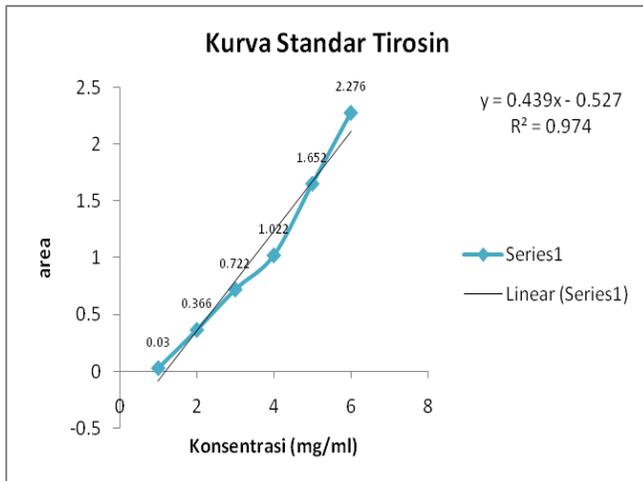
Tirosin merupakan asam amino aromatik yang dapat menyerap panjang gelombang 275 nm [10] sebagai larutan standar dalam uji aktivitas protease untuk mengukur aktivitas protease dalam memecah protein menjadi asam amino. Persamaan linier tirosin akan digunakan sebagai kurva standar untuk diinterpolasikan dengan nilai absorbansi yang diperoleh (Gambar 1).

Tabel 2 menunjukkan bahwa dari *Penicillium* sp. mendapatkan aktivitas protease optimum terjadi pada suhu 40^0C dengan pH 8 sebesar 2.416 U/ml. Berdasarkan pH optimumnya, protease di klasifikasikan pada protease asam, netral dan alkalin. Rentang pH 8 – 12 dapat diklasifikasikan sebagai protease alkalin [11]. Protease dengan aktivitas dan stabilitas tinggi pada kisaran protease alkalin dan suhu tinggi sangat baik digunakan pada aplikasi bioengineering dan bioteknologi [12].

pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Setiap enzim memiliki pH optimum di mana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif dalam mengikat substrat. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzim secara progresif hilang sampai pada akhirnya enzim menjadi tidak fungsional [13]. Aktivitas enzim yang menurun karena perubahan pH disebabkan oleh berubahnya keadaan ion substrat dan enzim. Perubahan tersebut dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kuaterner enzim aktif [14].

Faktor lain yang berpengaruh terhadap aktivitas protease

adalah suhu. Adanya peningkatan suhu akan meningkatkan



Gambar 1. Kurva standar tirosin.

Tabel 1. Aktivitas protease pada kontrol.

Kontrol	Suhu (°C)	pH				
		4	5	6	7	8
	30	0.35 ^[a]	0.36 ^[a]	0.36 ^[a]	0.35 ^[a]	0.35 ^[a]
	35	0.38 ^[a]	0.39 ^[a]	0.4 ^[a]	0.41 ^[a]	0.41 ^[a]
	40	0.4 ^[a]	0.38 ^[a]	0.38 ^[a]	0.39 ^[a]	0.4 ^[a]
	45	0.36 ^[a]	0.37 ^[a]	0.36 ^[a]	0.36 ^[a]	0.37 ^[a]
	50	0.36 ^[a]	0.35 ^[a]	0.37 ^[a]	0.37 ^[a]	0.37 ^[a]

Tabel 2. Aktivitas protease pada *Penicillium* sp.

<i>Penicillium</i> sp. 3 T ₃ F ₂	Suhu (°C)	pH				
		4	5	6	7	8
	30	1.04 ^[b]	1.11 ^[b]	1.20 ^[bc]	1.15 ^[bc]	1.3 ^[bc]
	35	1.01 ^[b]	1.05 ^[b]	1.14 ^[b]	1.2 ^[bc]	1.22 ^[bc]
	40	2.14 ^[de]	2.15 ^[de]	2.12 ^[de]	2.11 ^[de]	2.42 ^[de]
	45	1.80 ^[d]	1.84 ^[d]	1.9 ^[d]	1.9 ^[d]	1.95 ^[d]
	50	1.96 ^[de]	2.02 ^[de]	2.01 ^[de]	2.02 ^[de]	1.97 ^[de]

Keterangan: Tanda a menunjukkan kontrol, tanda b, bc, d, dan de pada kolom yang sama menunjukkan beda secara signifikan dengan kontrol, tanda bc dan de menunjukkan beda tetapi tidak secara signifikan berdasarkan Uji Duncan ($\alpha < 0,05$).

energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Akan tetapi, peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena enzim akan mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim. Namun, pada penelitian ini, suhu tidak berpengaruh terhadap aktivitas protease *Penicillium* sp. Kontrol negatif merupakan medium produksi protease tanpa penambahan isolat kapang. Aktivitas protease yang

dihasilkan oleh kontrol (Gambar 1) lebih kecil dibanding medium produksi dengan penambahan isolat.

IV. KESIMPULAN

Penicillium sp. merupakan jenis kapang yang menghasilkan aktivitas protease sebesar 2.416 U/mL dan dicapai pada pH 8 dan suhu 40°C. Berdasarkan uji statistik, diketahui bahwa pH berpengaruh terhadap aktivitas protease. Isolat *Penicillium* sp. merupakan kapang yang berpotensi sebagai penghasil protease serta sebagai agen bioremediasi limbah protein. Penelitian lebih lanjut mengenai kondisi lingkungan yang optimal seperti komposisi medium agitasi, serta jumlah inokulum untuk meningkatkan aktivitas protease yang diproduksi pada tiap - tiap isolat dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] G. Huang, Ying T., Huo P.& Jiang J, "Purification and characterization of a protease from thermophilic Bacillus strain HS08", *African Biotechnol.* Vol. 5 (2006) 2433 – 2438.
- [2] M.L.L. Martins., & W.C.A. Nascimento, "Studies On Stability Of Protease From *Bacillus* sp. and Its Compability With Commercial Detergent", *Brazilia.Microbiol.* Vol. 37 (2006) 307 – 311.
- [3] M.A. Mercado, T.M. Espino, M. Iizuka, K. Ito & N. Minamiura, "Producing and Partial Purification of Protease from *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn Biotech 1333", *Annual Report of International Center of Cooperative Research in Biotechnology.* Vol 13 (1990).
- [4] C. Sandhya, A. Sumantha, G. Szakacs, dan A. Pandey, "Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation", *Process Biochem.* Vol. 40 (2005) 2689 – 2694.
- [5] S. Rao, *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*, Jakarta: UI Press, (1994).
- [6] I.C.W. Daniel, *Fermentation and Enzyme Technology*, New York : Jhon Wiley and Sons, (1979).
- [7] M. Kosim dan S.R. Putra, "Pengaruh Suhu Pada Protease Dari *Bacillus subtilis*", Tugas Akhir, Jurusan Kimia, ITS, Surabaya (2010).
- [8] L. M. Zanphorline, H. Cabral, E. Arantes, D. Assis, L. Juliano, M.A. Juliano, R. Da-Silva, E. Gomes, dan G.O. Bonilla-Rodriguez, "Purification of New Alkaline Serine Protease From The Thermofilic Fungus *Myceliophthora sp.*", *Sciverse ScienceDirect, Process Biochemistry*, Vol. 46 (2011) 2137 – 2143.
- [9] T. Nakanishi, N. Minamiura, dan T. Yamamoto, *Agricultural Biological Chemistry*, Vol. 38 (1974) 37 – 44.
- [10] S. Sulastrri, *Pemanfaatan Protease Dari Akar Nanas Pada Proses Pembuatan Virgin Coconut Oil (VCO)*, Bandung: ITB, (2008).
- [11] W.J. North, "Comparative Biochemistry Of The Proteinases Of Eucaryotic Microorganisms", *Microbiological Reviews*, Vol. 46 (1982) 308 – 340.
- [12] M. Hajji, S. Kanoun, M. Nasri, dan N. Gharsallah, "Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1", *Process Biochemistry*, Vol. 42 (2007) 791 – 797.
- [13] A. L. Lehninger, *Biochemistry*, New York : Academic Press, (1998).
- [14] T. Palmer, *Understanding Enzymes*, England: Elli Horwood, (1981).