

Optimasi Enzim Isolat Bakteri Endofitik EUA-136 Dari *Sonneratia* Sp. Penghasil Protease

Anthoni Agustien¹⁾, Rima Dwitaviani²⁾, Yetti Marlida³⁾

^{1,2}Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas

³⁾Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas

anthoniagustien@sci.unand.ac.id(1) rimadwitaviani@gmail.com(2) yettimarlida@ansci.unand.ac.id(3)

ABSTRAK

Enzim protease memiliki kemampuan untuk memecah protein menjadi oligopeptida dan asam amino. Enzim yang dihasilkan oleh bakteri endofitik dapat diproduksi dalam skala besar tanpa perlu merusak atau menebang tanaman inangnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu, pH, dan waktu inkubasi optimum terhadap isolat bakteri endofitik EUA-136 dalam meningkatkan aktivitas enzim protease. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) tipe rancangan *Central Composite Design* (CCD) pada software Design Expert 13. Hasil dari penelitian ini didapatkan aktivitas protease dari isolat bakteri endofitik EUA-136 optimum pada suhu 30 °C, pH 8 dalam waktu inkubasi 15 menit.

Kata Kunci : optimasi, protease, bakteri endofitik, *response surface methodology*

ABSTRACT

Protease enzymes have the ability to break down proteins into oligopeptides and amino acids. Enzymes produced by endophytic bacteria can be produced on a large scale without the need to damage or cut down the host plant. This study aims to determine the optimum temperature, pH, and incubation time for endophytic bacterial isolate EUA-136 in increasing protease enzyme activity. This research is an experimental study using Response Surface Methodology (RSM) type of Central Composite Design (CCD) design on Design Expert 13 software. The results of this study obtained optimum protease activity of endophytic bacterial isolate EUA-136 at a temperature of 30 °C, pH 8 in an incubation time of 15 minutes.

Keywords: optimization, protease, endophytic bacteria, response surface methodology

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Indonesia memiliki ekosistem mangrove yang luas, memainkan peran penting dalam memberikan manfaat ekologis dan ekonomi bagi kehidupan manusia. Secara ekologis, hutan bakau bertindak sebagai penghalang alami terhadap abrasi pantai, angin topan, dan tsunami, sementara juga berfungsi sebagai habitat satwa liar yang vital (Zainal *et al.*, 2023). Ekosistem mangrove terletak pada zona daerah pertemuan antara laut dan daratan antara pasang naik dan surut. Daerah ini kaya akan material organik dan anorganik yang berperan dalam arus energi seperti bakteri. Bakteri memainkan peran penting dalam ekosistem bakau, berkontribusi pada siklus nutrisi dan menjaga keseimbangan dinamis habitat pesisir ini. Bakteri endofit telah dicirikan pada akar dan daun bakau, dengan spesies *Bacillus* lazim dan menunjukkan potensi untuk mendegradasi minyak mentah (Nnrrior, 2022). Bakteri dalam zona mangrove sangat beragam, termasuk bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif (Ayu *et al.*, 2017). Bakteri yang hidup pada perairan mangrove bersifat halofilik dan dapat hidup pada suhu hingga 27°C. Bakteri ini tumbuh di tempat dengan toleransi kadar garam tinggi. Untuk tetap hidup dan melakukan metabolisme, bakteri di tempat ekstrim membutuhkan jumlah protein yang tinggi. Bakteri mangrove menghasilkan enzim lipolitik, proteolitik, amilolitik, dan selulolitik (Wilis dan Subagiyo, 2012). Enzim adalah sekelompok protein yang katalisator dan mengatur perubahan kimiawi kimiawi dan mengatur perubahan-perubahan dalam sistem biologi. Enzim dapat diproduksi oleh hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Dalam mengkatalis suatu reaksi, enzim berfungsi dalam banyak reaksi hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerisasi, adisi dan terkadang pemutusan rantai karbon (Chia-Hung, 2022). Saat ini, peningkatan industri pengguna enzim dengan cepat, terutama kelompok enzim penghidrolisis seperti protease, amilase, lipase, kitinase, dan xilanase. Beberapa penelitian tentang enzim telah banyak dilakukan, karena enzim sebagai salah satu agen alternatif untuk menggantikan proses-proses kimiawi baik dalam industri maupun bidang bioteknologi (Neha, *et al.*, 2020). Enzim protease memainkan peran penting dalam berbagai industri seperti deterjen, penyamakan kulit, tekstil, pangan, proses pengolahan susu, farmasi, bir, dan pengelolaan limbah (Ashwini *et al.*, 2023). Enzim ini dipelajari secara ekstensif karena kemampuannya untuk mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida dalam protein, menjadikannya penting untuk berbagai aplikasi di bidang industri dan pengobatan (Sonia *et al.*, 2018). Enzim, termasuk protease, adalah biokatalis yang sangat spesifik yang bersumber dari asal mikroba untuk produksi komersial, memastikan hasil tinggi dan efektivitas biaya (Fernanda *et al.*, 2023; Archana *et al.*, 2023). Ada kebutuhan untuk mengembangkan enzim protease baru untuk aplikasi lebih lanjut yang diperlukan dari enzim-enzim ini. Enzim terutama seperti protease perlu dilakukan optimalisasi parameter pertumbuhan sangat penting untuk memaksimalkan produksi protease, meningkatkan kinerja katalitik, stabilitas, pH, dan toleransi termal. Spektrum luas aplikasi enzim protease menggarisbawahi nilai ekonomi dan signifikansinya di berbagai industri, menjadikannya alat bioteknologi yang sangat diperlukan untuk berbagai keperluan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keadaan optimum dari isolat bakteri endofitik EUA-136 dalam meningkatkan aktivitas protease.

2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini, yaitu:

1. Menganalisis suhu, pH, serta waktu inkubasi optimum terhadap isolat bakteri endofitik EUA-136 dalam meningkatkan aktivitas protease menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM)?
2. Bagaimana kondisi aktivitas protease sebelum dan sesudah optimasi?

3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. mengetahui suhu, pH, serta waktu inkubasi optimum terhadap isolat bakteri endofitik EUA-136 dalam meningkatkan aktivitas protease menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM)
2. Kondisi aktivitas protease sebelum dan sesudah optimasi?

4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk meningkatkan wawasan dan menyajikan data ilmiah mengenai optimasi suhu, pH, serta waktu inkubasi optimum terhadap isolat bakteri endofitik EUA-136 dalam meningkatkan aktivitas protease

I. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari s/d Mei 2024 di Laboratorium Bioteknologi, UPT Sumber Daya Hayati, Universitas Andalas.

Rancangan Penelitian atau Model

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan metode respon permukaan (*response surface methodology*/RSM) tipe rancangan *Central Composite Design* (CCD) pada software Design Expert 13.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah cawan Petri, tabung reaksi, gelas ukur, Erlenmeyer, termometer, pH meter, pipet tetes, gelas beker, jarum ose, autoclave, lampu spiritus, timbangan analitik, inkubator, gelas ukur, mikroskop, aluminium foil, kapas, kain kasa, tissue, centrifuge, mikropipet, mikrotips, eppendorf, platform shaker, shaker incubator, autoclaf, magnetic stirrer, hotplate stirrer, keranjang, spatula, spatula, laminar air flow, spektrofotometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat EUA-136 koleksi Laboratorium Bioteknologi yang berasal dari daun mangrove *Sonneratia* sp., medium Nutrient Agar (NA), KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl, Tris-HCl, TCA, Na_2CO_3 , KNO_3 , NaOH, kasein, folin ciocalteu, agar, tirosin, akuades, alkohol, spiritus,

Tahapan Penelitian

Peremajaan bakteri endofitik

Peremajaan isolat bakteri endofitik EUA-136 dilakukan dengan menggoreskan isolat bakteri pada tabung reaksi yang berisi medium NA.

Optimasi Enzim

Kondisi optimasi enzim dilakukan pengamatan dan pengujian aktivitas enzim metode Takami et al. (1989) dengan penentuan optimasi pada suhu, pH dan waktu inkubasi menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan percobaan tipe *Central Composite Design* (CCD) pada software statistic Design Expert 13. Variasi faktor perlakuan pada suhu (A) mulai dari suhu 20 °C hingga 40°C; pH (B) larutan bufer yang digunakan mulai dari 6 sampai 10; waktu inkubasi (C) mulai dari 5 sampai 25 menit.

Pengujian aktivitas protease

Pengujian aktivitas protease menggunakan metode takami yang sudah dimodifikasi, substrat kasein dipipetkan sebanyak 0,5 mL, selanjutnya ditambahkan larutan enzim

sebanyak 0,5 mL, ditambahkan 0,25 Tris-HCL buffer 50 pH optimum dan diinkubasi pada suhu optimum selama waktu optimum. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL TCA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Disentrifugasi pada 6000 rpm selama 20 menit, supernatan diambil sebanyak 0,375 mL dan ditambahkan 1,25 mL Na₂CO₃ dan 0,25 mL 1N Folin Ciocelteu. Pembacaan *Optical Density* dilakukan pada λ 578 nm. Penentuan nilai blanko dilakukan dengan cara yang sama, dimana 0,5 mL enzim diganti dengan 0,5 mL akuades. Penentuan nilai standar juga dilakukan dengan cara 0,5 mL sampel protease diganti dengan 0,5 mL tirosin

Rumus perhitungan aktivitas enzim protease:

$$UA = \frac{(Asp - Abl)}{(Ast - Abl)} \times \frac{1}{T} \times P$$

Keterangan:

UA : Unit Aktivitas Protease (unit/mL)

Asp : Absorbansi sampel

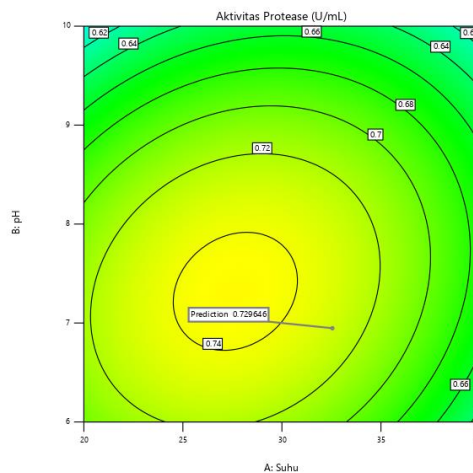
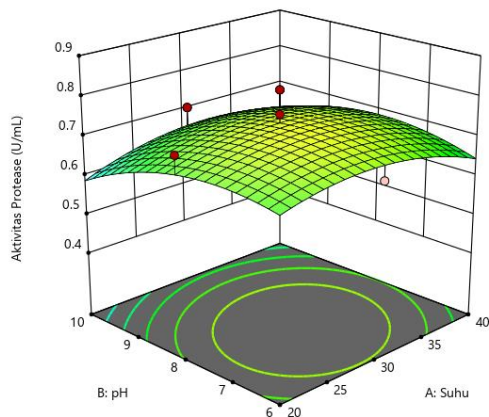
Abl : Absorbansi blanko

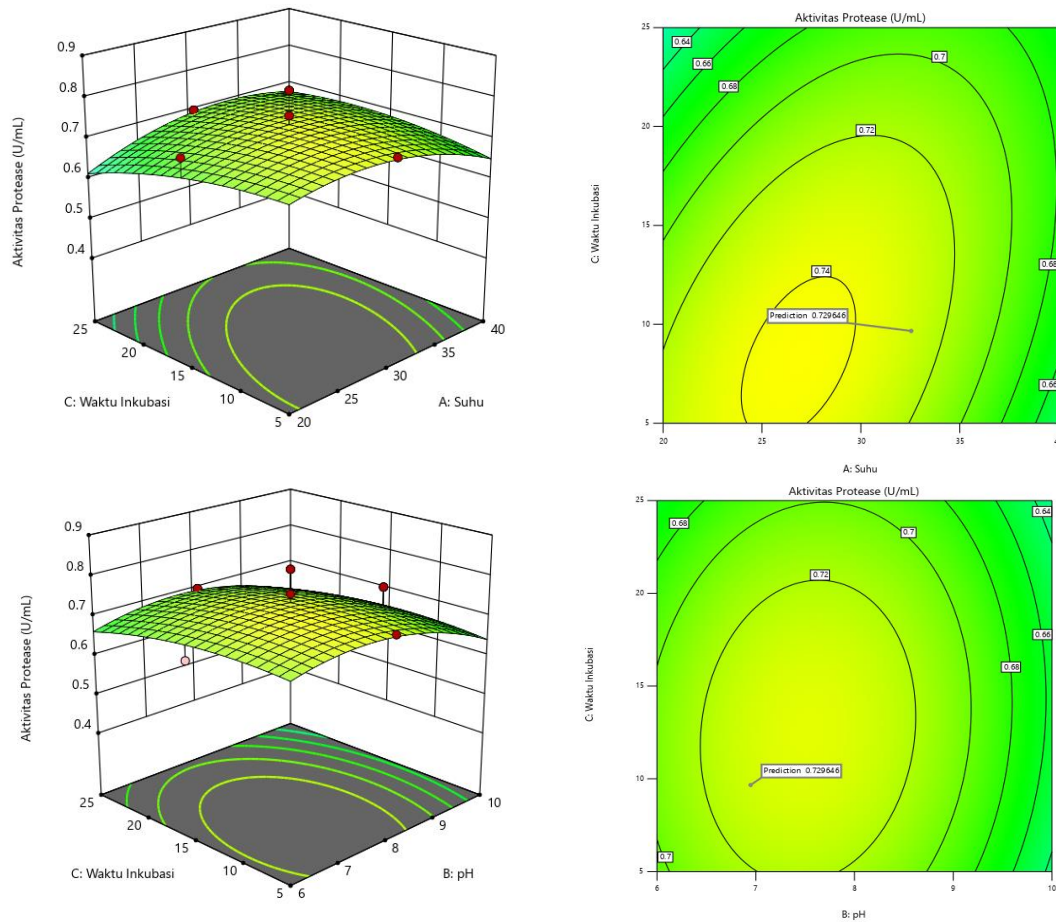
Ast : Absorbansi standar

T : Waktu inkubasi (menit)

II. HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi enzim dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kondisi yang diperlukan dalam menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi seperti suhu, pH dan waktu inkubasi yang akan digunakan bakteri untuk proses metabolismenya. Optimasi enzim (suhu, pH dan waktu inkubasi) dilakukan berdasarkan pengacakan kombinasi yang diatur oleh *Response Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan percobaan tipe *Central Composite Design* (CCD) pada Software statistic Design Expert 13. Kombinasi suhu (A), pH (B) dan waktu inkubasi (C).





Gambar 1. Response surface bentuk tiga dimensi (3D) aktivitas spesifik protease (U/mg) terhadap optimasi (A: suhu, B: pH dan C: waktu inkubasi).

Gambar 1 menampilkan bentuk tiga dimensi dari *response surface* suhu, pH, dan waktu inkubasi dan terdapat perbedaan warna dari bentuk 3D surfaceny. Sumbu x dan sumbu y memperlihatkan faktor yang di optimasi. Garis-garis yang muncul di sudut plot menunjukkan respons; area yang lebih hijau menunjukkan nilai respons yang lebih rendah, dan area yang lebih merah menunjukkan nilai respons yang lebih tinggi. Karena model kuadratik yang digunakan, bentuk grafik tiga dimensi berbentuk parabola. (Pitshou dan wasley, 2018). Gambar 1 menunjukkan response surface untuk faktor suhu, pH, dan waktu inkubasi. Diketahui bahwa titik respons ideal dalam penelitian ini berada di tengah spektrum., yaitu pada suhu 30⁰C, pH 8, dan waktu inkubasi 15 menit. Perlakuan pada suhu 30⁰C aktivitas spesifik lebih optimum dibandingkan suhu 20⁰C dan 40⁰C. Ini disebabkan oleh fakta bahwa meskipun reaksi enzimatik berlangsung lambat pada suhu rendah dan tinggi, peningkatan suhu akan mempercepat reaksi karena energi rata-rata molekul reaktan meningkat, yang pada gilirannya mengurangi energi aktivasi reaksi. Dengan demikian, laju reaksi akan meningkat sampai suhu ideal tercapai, di mana reaksi enzimatik mencapai puncaknya. (Van der Ent, 2023) . Gambar 1 menunjukkan pH optimal untuk enzim yaitu pH 8, hal ini diduga pada pH 8 dapat meningkatkan efisiensi reaksi, mengurangi waktu yang diperlukan untuk reaksi, dan menghindari kerusakan pada enzim (Nurkhotimah et al.,2017) Waktu inkubasi enzim yang optimal selama 15 menit dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor yang meliputi kinetika enzim, kondisi reaksi, stabilitas enzim dan konsentrasi substrat (Bohari & Ibrahim 2016). Semakin lama inkubasi reaksi enzim dapat meningkatkan laju reaksi enzim, yang berarti aktivitas enzim lebih banyak dihasilkan.

Namun, pada titik tertentu, aktivitas enzim tidak lagi meningkat karena diakrenakan enzim telah jenuh. (Buaben & Pelis, 2023) . Hartati (2012) menyatakan bahwa lama waktu inkubasi berpengaruh nyata dalam meningkatkan aktivitas protease isolat B2, dengan nilai tertinggi sebesar 0,148 U/ml selama 60 menit inkubasi. Waktu inkubasi yang terlalu lama menyebabkan aktivitas enzim menurun, yang berarti enzim mengalami perubahan struktur molekul atau terdenaturasi, sehingga tidak ada produk yang dihasilkan oleh aktivasi enzim. (Zusfahair, 2011).

Aktivitas Protease (U/mL)		Peningkatan aktivitas protease (kali)
Sebelum	Sesudah	
0,756	1,04	1,3

Peningkatan aktivitas itu menunjukkan bahwa berbagai faktor seperti suhu, pH, dan waktu inkubasi memengaruhi produksi enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Penelitian Aznia *et al.* (2014), diperoleh peningkatan aktivitas protease setelah dilakukan optimasi ekstrinsik pada isolat bakteri M5-24 yaitu mencapai 1,3 kali. Penelitian Liu pada tahun 2014 diperoleh peningkatan protease sekitar 3,6 kali setelah pengoptimalan pada *Bacillus subtilis* 100075. Sedangkan penelitian dari Chen *et al.*, (2023) bakteri *Bacillus subtilis* GC021 setelah dioptimasi aktivitas protease meningkat sebesar 3,5 kali.

III. KESIMPULAN

Dari optimasi yang telah dilakukan pada isolat bakteri endofitik EUA-136 dalam meningkatkan aktivitas protease diperoleh aktivitas optimum pada suhu 30 °C, pH 8 dalam waktu inkubasi 15 menit serta terjadi peningkatan aktivitas sebesar 1,3 kali.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashwini, Nilesh, Puntambekar., Manjusha, Dake. (2023). Microbial Proteases: Potential Tools for Industrial Applications. *Research Journal of Biotechnology*, doi: 10.25303/1802rjbt1590171
- Ayu K.D., Lisna M., Rolan R. 2017. Isolasi Bakteri Dari Tanah Mangrove *Rhizopora* Sp. Di Kota Bontang. Proceeding Of The 5th Mulawarman Pharmaceuticals Conferences. Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman. Samarinda.
- Aznia, A., A. Agustien & N. Nasir. 2014. Optimasi Parsial Isolat Termofilik M5-24 dalam Produksi Protease. *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA.)* 3(3): 238-243.
- Buaben, Aaron O., and Ryan M. Pelis. 2023. Incubation Time Influences Organic Anion Transporter 1 Kinetics and Renal Clearance Predictions. *Journal of Xenobiotics* 13(2): 205–17
- Chen, Jingying., Gu, Yan. 2023. Optimization of fermentation conditions for protease production from *Bacillus subtilis*. *BIO web of conferences*, doi: 10.1051/bioconf/20235901006
- Chia-Hung, Kuo., Chun-Yung, Huang., Chwen-Jen, Shieh., C, D, Dong. (2022). Enzymes and Biocatalysis. *Catalysts*, doi: 10.3390/catal12090993
- Fernanda, Cosme., António, Inês., Alice, Vilela. (2023). Microbial and Commercial Enzymes Applied in the Beverage Production Process. *Fermentation*, doi: 10.3390/fermentation9040385
- Hartanti, Lilis. Yusiati Mira Lisa (2012). *Karakterisasi Protease dan Isolat Bakteri Pendegradasi Tepung Bulu*. Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat Kalimantan Selatan

Agustien A, Dwitaviani R, Marlida Y : Optimasi Enzim Isolat Bakteri Endofitik EUA-136 Dari *Sonneratia* Sp. Penghasil Protease.

- Neha, V., Agrawal., Nayana, A., Patil. (2020). Enzyme Technology Prospects and Their *Biomedical Applications*. doi: 10.1007/978-981-15-2063-1_9
- Nrior., Renner, Renner., Douglas, Salome, Ibietela., Somiari., Adaobi, Assumpta, Abiye. (2022). Culture on Nutritive Media and Characterization of Some Endophytic Bacteria Isolated from the Roots and Leaves of Mangrove Plants: *Avicennia germinans*, *Acrostichum aureum* and *Rhizophora mangle*. *Journal of advances in microbiology*, doi: 10.9734/jamb/2022/v22i11675
- Pitshou, Bokoro., Wesley, Doorsamy. (2018). Contour Plots-Based Approach for Reliability Analysis of Small Data Sets of Varistor Arrester's Failure Times. doi: 10.1109/EEEIC.2018.8494614
- Sonia, Barberis., Sonia, Barberis., Mauricio, Omar, Adaro., Mauricio, Omar, Adaro., Anabella, Lucía, Origone., Anabella, Lucía, Origone., Grisel, Bersi., Grisel, Bersi., Fanny, Guzmán., Andrés, Illanes. (2018). Peptide Synthesis Using Proteases as Catalyst. doi: 10.1007/978-3-319-97132-2_4
- Subagiyo., Muhammad S. R. D., Wilis A.S. (2017). Potensi Ekosistem Mangrove Sebagai Sumber Bakteri Untuk Produksi Protease, Amilase Dan Selulase. *Jurnal Kelautan Tropis*. Vol. 20(2):106–111.(ISSN 0853-7291).
- Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 120-124.
- Van der Ent, Florian. (2023). Computational Design of the Temperature Optimum of an Enzyme Reaction. *Science Advances* 9(26): 1–9
- Zainal, Abidin., Dhira, Kurniawan, Saputra., Mochammad, Fattah., Nuddin, Harahab., Andriani, Kusumawati. (2023). Mangrove potential assessment for determining ecotourism attraction and strengthening destination branding and marketing: "gunung pithing mangrove conservation", indonesia. *Geojournal of Tourism and Geosites*, doi: 10.30892/gtg.47204-1036
- Zusfahair. (2011). Amobilisasi Protease dari *Bacillus* sp. BT 1 Menggunakan Poliakrilamida. *Jurnal molekul*, Vol 6 No 2.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
15 Mei 2024	20 Mei 2024	18 Juni 2024	Ya