

## Optimasi Variasi Sumber Karbon dan Nitrogen Isolat Bakteri Endofitik dari Tanaman *Bruguiera gymnorrhiza* dalam Menghasilkan *Crude Enzim Protease*

Anthoni Agustien (1\*), Yetti Marlida (2), Miftahul Zovia (1)

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas

<sup>2</sup>Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas

[anthoniagustien@sci.unand.ac.id](mailto:anthoniagustien@sci.unand.ac.id) (1\*), [yettimarlida@ansci.unand.ac.id](mailto:yettimarlida@ansci.unand.ac.id) (2), [miftahulzoviaa20@gmail.com](mailto:miftahulzoviaa20@gmail.com) (3)

### ABSTRAK

Enzim protease merupakan salah satu enzim komersial yang memiliki berbagai manfaat dan aplikasi pada bidang industri. Enzim protease dapat dihasilkan oleh mikroorganisme dan dapat dilakukan optimasi untuk menghasilkan aktivitas enzim yang optimum. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui jenis sumber karbon dan sumber nitrogen terbaik dalam menghasilkan enzim protease. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen menggunakan beberapa variasi jenis sumber karbon dan nitrogen untuk melihat aktivitas enzim protease melalui ekstrak kasar enzim (*crude enzyme extract*) yang dihasilkan. Hasil didapatkan dari penelitian ini adalah sumber karbon yang terbaik berupa maltosa, sedangkan sumber nitrogen terbaik merupakan kalium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) konsentrasi 1% (v/v), dengan aktivitas protease sebesar 1,136 U/mL.

**Kata Kunci** : Bakteri, Endofitik, Karbon, Nitrogen, Protease

### ABSTRACT

The protease enzyme is a commercial enzyme that has various benefits and applications in the industrial sector. Protease enzymes can be produced by microorganisms and optimization can be carried out to produce optimum enzyme activity. The aim of the research is to determine the best type of carbon source and nitrogen source in producing protease enzymes. This research was carried out using experimental methods using several variations of carbon and nitrogen sources to see protease enzyme activity from crude enzyme extract that produced. The results obtained from this research are that the best carbon source is maltose, while the best nitrogen source is potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ ) concentration 1% (v/v), with the protease activity of 1,136 U/mL.

**Keywords** : Bacteria, Endophytic, Carbon, Nitrogen, Protease

## I. PENDAHULUAN

### 1. Latar Belakang

Enzim merupakan senyawa protein yang berfungsi sebagai katalis alami. Salah satu enzim yang paling berpengaruh pada bidang industri adalah enzim protease (Sutay Kocabaş & Grumet, 2019). Protease merupakan enzim yang berperan penting dalam menghidrolisis protein menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino sehingga menjadi enzim komersial yang memiliki banyak manfaat di bidang industri. Enzim protease menempati sekitar 60% dari total penjualan enzim di dunia (Razzaq et al., 2019). Protease memainkan peran penting dalam bidang kesehatan, karena mampu meningkatkan daya cerna dan mempercepat recovery atau penyembuhan luka pada sistem pencernaan yang mengalami defisiensi enzim, sehingga protease dapat menjadi komponen utama penyusun obat oral pencernaan (Agustien et al., 2024). Protease sebagian besar diperoleh dari tanaman dan hewan, namun keterbatasan sumberdaya, dan bioethics menjadi suatu hambatan. Dengan demikian, protease yang berasal dari mikroorganisme menjadi perhatian karena dapat mensintesis enzim skala besar dengan tingkat hasil yang tinggi. Hampir dua pertiga dari protease komersial di pasar dunia saat ini berasal dari mikroorganisme (Gurumallesh et al., 2019). Bakteri endofitik adalah bakteri yang dapat membentuk koloni dalam jaringan internal tumbuhan. Bakteri endofitik dapat menghasilkan enzim sebagai hasil metabolit primernya. Bakteri endofitik dianggap sebagai sumber penting enzim ekstraseluler, beberapa penelitian telah menghasilkan enzim seperti protease, amilase, selulase, asparaginase, dan lain-lain (Lestari et al., 2019). Bakteri endofitik menghasilkan enzim hidrolitik untuk melawan mikroba patogen tanaman dan dapat menjadi alternatif untuk mengatasi resistensi obat kimia, selain itu pertumbuhan bakteri endofitik dapat ditingkatkan melalui optimasi dengan merekayasa lingkungan ekstrinsiknya seperti komposisi medium, seperti sumber karbon dan nitrogen sehingga produksi enzim yang dihasilkan lebih optimum (Agustien et al., 2018). Sumber karbon diperlukan bakteri dalam metabolisme sedangkan nitrogen penting dalam menjaga kestabilan sel dan sintesis protein. Sumber karbon dan nitrogen dapat mempengaruhi kelangsungan hidup mikroorganisme sekaligus mempengaruhi produksi enzim sebagai produk metabolit primer mikroorganisme. Oleh karena itu, penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui jenis sumber karbon dan nitrogen yang baik dan optimum bagi mikroorganisme endofitik *Bruguiera gymnorrhiza* dalam memproduksi ekstrak kasar enzim protease.

### 2. Perumusan Masalah

Pada penelitian ini terdapat beberapa rumusan masalah, yaitu:

1. Apakah jenis sumber karbon yang dapat menginduksi bakteri endofitik dari *Bruguiera gymnorrhiza* dalam memproduksi enzim protease?
2. Apakah jenis sumber nitrogen yang dapat menginduksi bakteri endofitik dari *Bruguiera gymnorrhiza* dalam memproduksi enzim protease?
3. Bagaimanakah hasil aktivitas enzim protease dari ekstrak kasar enzim yang dihasilkan oleh bakteri endofitik *Bruguiera gymnorrhiza* sebelum dan sesudah optimasi?.

### 3. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai yaitu

1. Menganalisis jenis sumber karbon terbaik terhadap bakteri endofitik dari *Bruguiera gymnorrhiza* dalam memproduksi enzim protease.
2. Menganalisis jenis sumber nitrogen terbaik terhadap bakteri endofitik dari *Bruguiera gymnorrhiza* dalam memproduksi enzim protease.
3. Menganalisis hasil aktivitas enzim protease dari ekstrak kasar enzim yang dihasilkan oleh bakteri endofitik *Bruguiera gymnorrhiza* sebelum dan sesudah optimasi.

#### 4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai jenis sumber karbon dan sumber nitrogen isolat bakteri *Bruguiera gymnorrhiza* dalam memproduksi enzim protease.

## II. METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium UPT Biota Sumatera, Universitas Andalas. Adapun penelitian ini dilakukan dari bulan maret-mei 2024

### Rancangan Penelitian atau Model

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Tahapan penelitian dilakukan dengan menentukan kondisi optimum isolat bakteri *Bruguiera gymnorrhiza* penghasil protease koleksi dari Laboratorium UPT Biota Sumatera untuk mengetahui pengaruh jenis sumber karbon dan sumber nitrogen yang optimum dalam menghasilkan ekstrak kasar enzim protease. Data disajikan dalam bentuk histogram.

### Bahan dan Peralatan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *centrifuge*, tabung reaksi, *shaker*, *incubator*, *ependorf*, mikropipet, timbangan, gelas ukur dan spektrofotometer. Sedangkan bahan pada penelitian ini adalah isolate bakteri endofitik dari tanaman *Bruguiera gymnorrhiza* koleksi Laboratorium UPT Biota Sumatera, *nutrient agar* (NA), maltose, glukosa, sukrosa, laktosa,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , NaCl, Tris-HCl, TCA,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ , akuades, alkohol, dan spritus.

### Tahapan Penelitian

1. Peremajaan bakteri  
Isolat bakteri koleksi laboratorium diremajakan dengan menggores biakan murni pada media NA (Nutrient Agar) yang baru. Selanjutnya inkubasi dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam.
2. Penentuan sumber karbon optimum untuk produksi protease  
Medium produksi ditambahkan dengan variasi sumber karbon yaitu glukosa, laktosa, sukrosa dan maltosa dengan konsentrasi masing-masing 1%. Medium produksi diinkubasi pada kondisi optimum yang didapatkan dari penelitian sebelumnya dan dicuplik pada waktu idiofase.
3. Penentuan sumber nitrogen optimum untuk produksi protease  
Medium produksi ditambahkan dengan variasi sumber nitrogen yaitu  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , dan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dengan konsentrasi masing-masing 1%. Medium produksi diinkubasi pada kondisi optimum yang didapatkan dari penelitian sebelumnya dan dicuplik pada waktu idiofase.
4. Pengukuran aktivitas enzim protease dari ekstrak kasar enzim  
Pengukuran ekstrak kasar enzim protease mengikuti metode Takami et al., (1989). Substrat kasein dipipetkan sebanyak 0,5 mL, selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, 0,25 Tris-HCL buffer 50 pH 8,0 dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 15 menit. Kemudian dipipetkan 0,5 mL TCA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 20 menit. Selanjutnya, sentrifugasi pada 6000 rpm selama 20 menit, 0,375 mL supernatan diambil dan ditambahkan 1,25 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 0,25 mL 1N *Folin Cioceltea*. Pengukuran *Optical Density* pada  $\lambda$  578 nm spektrofotometer. Nilai blanko ditentukan dengan mengganti 0,5 mL enzim menjadi 0,5 mL akuades, dan *optical density* diukur dengan cara yang sama. Penentuan nilai standar juga dilakukan dengan cara 0,5 mL sampel protease diganti dengan 0,5 mL tirosin.

5. Rumus perhitungan:

$$\text{Aktivitas enzim protease} = \frac{(Asp - Abl)}{(Ast - Abl)} \times \frac{1}{T}$$

Keterangan:

UA : Unit Aktivitas Protease (unit/mL)

Asp : Absorbansi sampel

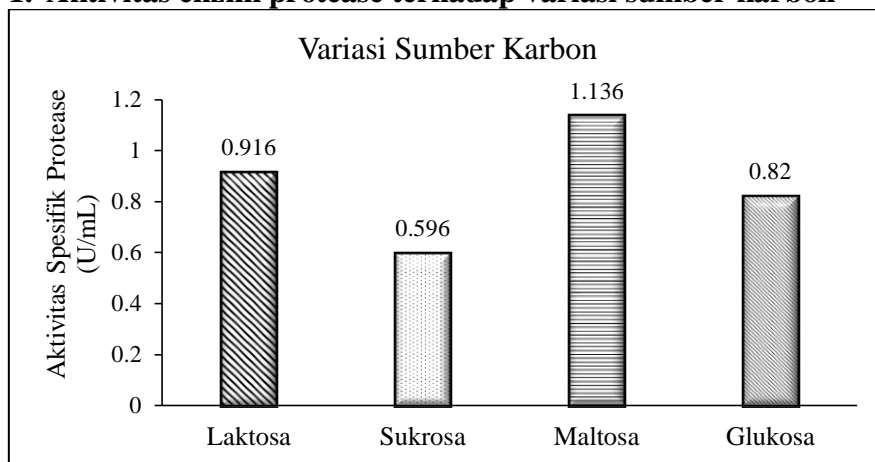
Abl : Absorbansi blanko

Ast : Absorbansi standar

T : Waktu inkubasi (menit).

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 1. Aktivitas enzim protease terhadap variasi sumber karbon

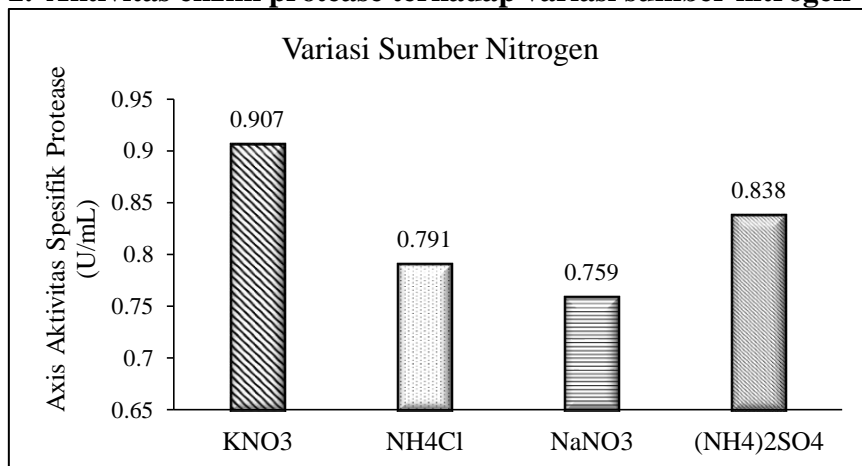


**Gambar 1.** Histogram Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Bakteri Endofitik terhadap Variasi Sumber Karbon

Gambar 1. menunjukkan isolat bakteri endofitik *Bruguiera gymnorrhiza* dapat menggunakan empat jenis sumber karbon untuk menghasilkan enzim protease. Dari keempat jenis sumber karbon yang digunakan (glukosa, fruktosa, laktosa dan maltosa), karbon berupa maltose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) memiliki aktivitas enzim protease yang lebih tinggi dibandingkan sumber karbon lainnya, dengan aktivitas spesifik protease sebesar 1,136 U/mL. Pati dan maltosa menjadi sumber karbon yang paling efektif dalam produksi protease (Silva et al., 2007). Bakteri yang dapat menggunakan maltosa dari lingkungan sekitarnya merupakan bakteri yang memiliki transporter yang khusus untuk menggunakan maltosa dari lingkungan eksternal dan memasukkannya ke dalam sel bakteri. Transporter ini memungkinkan maltosa masuk ke dalam sel dan berinteraksi dengan komponen seluler yang terlibat dalam regulasi aktivitas protease. Salah satu transporter yang khusus untuk mengambil maltosa dari lingkungan eksternal pada bakteri adalah transporter maltosa yang disebut sebagai Maltose Transport System (MTS) atau Maltose Permease. MTS umumnya terdiri dari beberapa komponen yang bekerja sama untuk mengambil maltosa ke dalam sel bakteri (Saier Jr et al., 2016). Maltose selanjutnya akan dihidrolisis dan menghasilkan dua satuan glukosa dengan menggunakan katalis enzim maltase atau katalis asam. Banyak peneliti telah melaporkan bahwa maltosa lain dapat meningkatkan hasil produksi protease. Contohnya, dalam penelitian Malathi & Chakraborty, (1991), maltosa terbukti sebagai sumber karbon yang efektif untuk meningkatkan produksi enzim protease. (Tsuchiya et al., 1991) juga melaporkan penggunaan maltosa untuk produksi enzim protease yang tinggi. Maltosa digunakan sebagai sumber karbon dalam produksi protease karena efektivitasnya dalam meningkatkan hasil protease. Penelitian oleh Bezawada et al., (2010) menunjukkan

bahwa suplementasi maltosa menghasilkan peningkatan produksi protease yang tinggi oleh *B. licheniformis* ATCC 21424 dibandingkan dengan sumber karbon uji lain.

## 2. Aktivitas enzim protease terhadap variasi sumber nitrogen



**Gambar 2.** Histogram Aktivitas Enzim Protease dari Isolat Bakteri Endofitik terhadap Variasi Sumber Nitrogen

Gambar 2. menunjukkan bahwa aktivitas enzim isolat bakteri mengalami peningkatan yang signifikan pada penambahan sumber nitrogen berupa kalium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) sebesar 0,907 U/mL. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa Kalium nitrat dapat berpengaruh positif terhadap produksi enzim oleh bakteri tertentu. Sebagai contoh, sebuah penelitian yang dilakukan oleh Agwa & Abu, (2016) menunjukkan bahwa penambahan  $\text{KNO}_3$  ke dalam medium kultur *Bacillus* sp. S5 dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase. Penelitian lain oleh Qu et al., (2016) menunjukkan bahwa penambahan  $\text{KNO}_3$  ke dalam medium kultur *Bacillus amyloliquefaciens* dapat meningkatkan produksi enzim protease dan amilase. Penambahan  $\text{KNO}_3$  dapat meningkatkan aktivitas protease karena dapat menyediakan nitrat ( $\text{NO}_3$ ) sebagai sumber nitrogen. Nitrat adalah bentuk oksidasi nitrogen yang dapat digunakan oleh bakteri sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhan dan sintesis protein. Beberapa bakteri memiliki jalur metabolisme nitrat yang memungkinkan mereka mengambil nitrat dari lingkungan dan menggunakannya sebagai sumber nitrogen (Nelson et al., 2017). Kalium nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) memainkan peran penting dalam produksi protease. Penambahan  $\text{KNO}_3$  dalam media fermentasi telah terbukti meningkatkan hasil enzim protease, karena berkontribusi pada peningkatan tingkat produksi. Sebuah studi tentang *Streptomyces fradiae* menunjukkan bahwa penambahan  $\text{KNO}_3$  dalam media sintesis menyebabkan peningkatan substansif dalam hasil enzim protease, mencapai hingga 930 P.U/mL, peningkatan tiga kali lipat dibandingkan dengan hasil awal (Santosa et al., 2013). Selanjutnya, dalam konteks mutasi UV *Bacillus subtilis*,  $\text{KNO}_3$  digunakan sebagai sumber nitrogen anorganik dalam media fermentasi, dengan tujuan menginduksi strain yang bermutasi untuk menghasilkan unit protease yang tinggi, hasil penelitian menunjukkan aktivitas protease yang dihasilkan mencapai maksimum hingga 455,25 unit (Sher et al., 2012). Oleh karena itu,  $\text{KNO}_3$  berfungsi sebagai komponen penting dalam mempromosikan dan mengoptimalkan produksi protease di berbagai strain mikroba.

## 3. Kondisi Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Protease Sebelum dan Sesudah Optimasi

Tabel 1. Aktivitas protease isolate bakteri endofitik *Bruguiera gymnorrhiza* sebelum dan sesudah optimasi

Agustien A, Marlida Y, Zovia M : Optimasi Variasi Sumber Karbon Dan Nitrogen Isolat Bakteri Endofitik Dari Tanaman *Bruguiera gymnorrhiza* Dalam Menghasilkan Crude Enzim Protease

Aktivitas Spesifik Protease (U/mL)		Peningkatan Aktifitas Protease (kali)
Sebelum	Sesudah	
0,861	1,136	1,31

Table 1. menunjukkan optimasi sumber karbon dan sumber nitrogen pada bakteri endofitik *Bruguiera gymnorrhiza* penghasil protease memberikan peningkatan produksi protease. Produksi protease sebelum optimasi dilakukan tanpa penambahan sumber karbon dan sumber nitrogen terbaik. Hasil optimasi menunjukkan peningkatan aktivitas protease sebesar 1,31 kali, hal ini membuktikan bahwa faktor abiotik memberikan pengaruh terhadap bakteri dalam produksi enzim. Peningkatan produksi enzim oleh mikroorganisme dapat dilakukan dengan melakukan rekayasa komposisi medium, berupa sumber karbon dan nitrogen. Penelitian Aznia et al., (2014), menunjukkan peningkatan aktivitas protease setelah dilakukan optimasi ekstrinsik pada isolat bakteri M5-24 yaitu mencapai 1,75 kali.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa jenis sumber karbon dan nitrogen yang optimum dalam menginduksi bakteri endofitik *Bruguiera gymnorrhiza* dalam memproduksi protease adalah maltose dan KNO<sub>3</sub> 1% (v/v) dengan aktivitas ekstrak kasar enzim protease tertinggi sebesar 1,136 U/mL dan peningkatan sebelum dan sesudah optimasi mencapai 1,31 kali.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A., Melhanza, Z. N., Annisa, A., Husnah, Q., Nasir, N., & Rilda, Y. (2018). Isolation and Screening Protease Acid, Neutral and Alkaline Producing Bacteria from Dadih (Traditional Indonesian Food). Available Online Wwww.Jocpr.Com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 10(1), 50–54. www.jocpr.com
- Agustien, A., Muqarramah, M., & Alamsjah, F. (2024). Optimization and Molecular Identification of Protease-Producing Thermophilic Bacterial Isolate TUA-26. OnLine Journal of Biological Sciences, 24(3), 321–329.
- Agwa, O. K., & Abu, G. O. (2016). Influence of various nitrogen sources on biomass and lipid production by *Chlorella vulgaris*. British Biotechnology Journal, 15(2), 1–13.
- Aznia, A., Agustien, A., Nasril, D., Laboratorium, N., Mikrobiologi, R., & Biologi, J. (2014). Optimasi Parsial Isolat Termofilik M5-24 dalam Produksi Protease Partial Optimization of Thermophilic Isolate M5-24 on Protease Production. Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA.), 3(3), 238–243.
- Bezawada, J., Yan, S., John, R. P., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Augmentation of protease production by supplementing carbon and nitrogen sources into wastewater sludge medium. JOURNAL OF RESIDUALS SCIENCE & TECHNOLOGY, 7(3), 161–172.
- Gurumalles, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. In International Journal of Biological Macromolecules (Vol. 128, pp. 254–267). Elsevier B.V.
- Lestari, K., Agustien, A., & Djamaan, A. (2019). Potensi Jamur Endofit pada Tumbuhan Mangrove *Avicennia marina* di Kuala Enok Indragiri Hilir sebagai Penghasil Antibiotika The Potential of Endophytic Fungi Isolated from Leaves, Stems, Mangrove Roots *Avicennia marina* as a Producer of Antibiotics. JURNAL METAMORFOSA, 6(1), 83–89.

Agustien A, Marlida Y, Zovia M : Optimasi Variasi Sumber Karbon Dan Nitrogen Isolat Bakteri Endofitik Dari Tanaman *Bruguiera gymnorrhiza* Dalam Menghasilkan Crude Enzim Protease

- Malathi, S., & Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 712–716.
- Nelson, J. W., Atilho, R. M., Sherlock, M. E., Stockbridge, R. B., & Breaker, R. R. (2017). Metabolism of free guanidine in bacteria is regulated by a widespread riboswitch class. *Molecular Cell*, 65(2), 220–230.
- Qu, X. M., Wu, Z. F., Pang, B. X., Jin, L. Y., Qin, L. Z., & Wang, S. L. (2016). From Nitrate to Nitric Oxide: The Role of Salivary Glands and Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*, 95(13), 1452–1456. <https://doi.org/10.1177/0022034516673019>
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Saier Jr, M. H., Reddy, V. S., Tsu, B. V, Ahmed, M. S., Li, C., & Moreno-Hagelsieb, G. (2016). The transporter classification database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D372–D379.
- Santosa, E., Halimah, S., Susila, A. D., Lonto, A. P., Mine, Y., & Sugiyama, N. (2013). KNO 3 Application Affect Growth and Production of *Amorphophallus muelleri* Blume. *Indonesian Journal of Agronomy*, 41(3).
- Sher, M. G., Nadeem, M., Syed, Q., Irfan, M., & Baig, S. (2012). Protease production from UV mutated *Bacillus subtilis*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 47(1), 69–76.
- Silva, C. R. da, Delatorre, A. B., & Martins, M. L. L. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 253–258.
- Springer-Verlag, ©, Takami, H., Akiba, T., & Horikoshi, K. (1989). *Applied Microbiology Biotechnology Production of extremely thermostable alkaline protease from Bacillus* sp. no. AH-101. In *Appl Microbiol Biotechnol* (Vol. 30).
- Sun, Y., Qian, Y., Zhang, J., Wang, Y., Li, X., Zhang, W., Wang, L., Liu, H., & Zhong, Y. (2021). Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. *Journal of Basic Microbiology*, 61(2), 122–132.
- Sutay Kocabaş, D., & Grumet, R. (2019). Evolving regulatory policies regarding food enzymes produced by recombinant microorganisms. In *GM Crops and Food* (Vol. 10, Issue 4, pp. 191–207). Taylor and Francis Ltd.
- Tsuchiya, K., Sakashita, H., Nakamura, Y., & Kimura, T. (1991). Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(12), 3125–3127.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
08 Juni 2024	18 Juni 2024	23 Juli 2024	Ya