

Optimasi Sumber Karbon Dan Nitrogen Isolat Bakteri Termofilik TUA-504 Penghasil Protease

Assyifa Syafrita (1), Anthoni Agustien(2*), Yetti Marlida(3),

(1)Departemen Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas

(2*)Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas

assyifasyafrita64@gmail.com (1), anthoniagustien@sci.unand.ac.id (2*), yettimarlida@ansci.unand.ac.id (3),

ABSTRAK

Protease merupakan enzim yang paling banyak dimanfaatkan diberbagai industri seperti industri kesehatan, farmasi, deterjen, makanan, dan tekstil. Protease termasuk golongan enzim hidrolase yang mampu memecah protein menjadi oligopeptida pendek atau asam amino. Enzim mudah terdenaturasi pada suhu tinggi. Sedangkan dalam industri, protease lebih banyak diaplikasikan pada suhu tinggi. Sehingga diperlukan enzim yang tahan terhadap suhu tinggi (termostabil). Enzim termostabil yang dihasilkan oleh bakteri termofilik sangat dibutuhkan dalam bidang industri karena kemampuannya yang tahan terhadap suhu tinggi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui sumber karbon dan sumber nitrogen optimum terhadap isolat bakteri termofilik TUA-504 produksi protease. Metode penelitian dilakukan secara eksperimen dengan menggunakan variasi sumber karbon dan sumber nitrogen konsentrasi 1% untuk mendapatkan kondisi optimum dari aktivitas protease. Hasil dari penelitian ini didapatkan kondisi optimum isolat bakteri termofilik TUA-504 dalam memproduksi protease yaitu pada sumber karbon glukosa dan sumber nitrogen NaNO_3 .

Kata Kunci : Bakteri termofilik, karbon, nitrogen, optimasi, protease.

ABSTRACT

Protease is an enzyme that is most widely used in various industries such as the health, pharmaceutical, detergent, food and textile industries. Proteases are a class of hydrolase enzymes that are able to break down proteins into short oligopeptides or amino acids. Enzymes are easily denatured at high temperatures. Meanwhile, in industry, proteases are mostly applied at high temperatures. So an enzyme is needed that is resistant to high temperatures (thermostable). Thermostable enzymes produced by thermophilic bacteria are needed in the industrial sector because of their ability to withstand high temperatures. The aim of this research was to determine the optimum carbon source and nitrogen source for the thermophilic bacterial isolate TUA-504 producing protease. The research method was carried out experimentally using a variety of carbon sources and nitrogen sources with a concentration of 1% to obtain optimum conditions for protease activity. The results of this research showed that the optimum conditions for the thermophilic bacterial isolate TUA-504 in producing protease were the carbon source glucose and the nitrogen source NaNO_3 .

Keywords : Thermophilic Bacteria, Carbon, Nitrogen, Optimization, Protease.

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Kebutuhan protease di dunia menempati urutan pertama dalam penjualan enzim sekitar 60% dari total penjualan enzim di dunia dimana 52% diantaranya merupakan protease alkalin (Naveed et al., 2021). Protease mampu memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti oligopeptida pendek/ asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Protease banyak dimanfaatkan di berbagai industri seperti industri deterjen, terutama dalam formulasi deterjen cucian, pemrosesan kulit, dan sintesis peptida (Si et al., 2018; Adelere dan Lateef, 2019). Selain itu, dimanfaatkan dalam industri lain seperti makanan, farmasi, kosmetik (Razzaq et al., 2019), fotografi, sutra, roti, tekstil, susu, bioremediasi (Dutta et al., 2016) Protease banyak diaplikasikan pada suhu tinggi (termostabil). Bakteri termofilik mendapatkan banyak perhatian sebagai sumber enzim protease termostabil yang penting. Pengaplikasian dalam berbagai bidang industri terutama dalam bidang kesehatan, farmasi, deterjen, makanan, penyamakan kulit, karena pertumbuhannya yang cepat, hasilnya mudah ditingkatkan melalui pengaturan kondisi pertumbuhan, serta mampu menghasilkan enzim pada kondisi yang ekstrim (Fachrial et al., 2021). Kebutuhan enzim protease di Indonesia dapat mencapai lebih dari 2.500 ton/tahun dan terus meningkat. Kebutuhan enzim protease dipenuhi melalui impor sehingga berdampak pada devisa negara (Ramadhan et al., 2023). Strategi untuk mengurangi impor enzim adalah dengan mengeksplorasi sumber enzim protease yang bersifat termostabil. Enzim termostabil dapat diperoleh dari bakteri yang hidup pada lingkungan yang memiliki suhu tinggi seperti sumber air panas. Isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Sungai Medang, Kerinci diperoleh 29 isolat (Agustien et al., 2024). Penelitian pendahuluan menunjukkan isolat bakteri termofilik TUA-504 menghasilkan protease paling tinggi. Agar enzim dapat digunakan untuk aplikasinya maka aktivitas enzim perlu ditingkatkan. Salah satu teknik untuk meningkatkan aktivitas enzim yaitu melalui optimasi terhadap bakteri tersebut. Pada penelitian ini optimasi dilakukan dengan merekayasa lingkungan ekstrinsiknya seperti sumber karbon dan nitrogen. Sumber karbon dan sumber nitrogen merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan produk mikroorganisme. Nitrogen sangat diperlukan untuk pertumbuhan sel, sedangkan unsur karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui jenis sumber karbon dan nitrogen optimum isolat bakteri termofilik TUA-504 produksi protease.

2. Perumusan Masalah

Perumusan masalah dalam pengabdian ini, yaitu apakah jenis sumber karbon dan sumber nitrogen optimum terhadap isolat bakteri termofilik TUA-504 dalam memproduksi protease?.

3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui jenis sumber karbon dan sumber nitrogen optimum terhadap bakteri termofilik TUA-504 dalam memproduksi protease.

4. Manfaat Penelitian

Serta manfaat penelitian ini yaitu memberikan informasi ilmiah mengenai sumber karbon dan sumber nitrogen yang optimum untuk produksi protease oleh isolat termofilik TUA-504.

II. METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, 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 dari variasi sumber karbon dan sumber nitrogen menggunakan isolat bakteri termofilik TUA-504 dalam menghasilkan protease.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah cawan Petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, termometer, pH meter, jarum ose, autoclave, lampu spiritus, timbangan analitik, inkubator, mikroskop, centrifuge, shaker, autoclave, laminar air flow, dan spektrofotometer. Sedangkan bahan yang digunakan adalah isolat TUA-504 koleksi Laboratorium Bioteknologi, UPT Biota Sumatera, Universitas Andalas yang berasal dari sumber air panas Sungai Medang, Kabupaten Kerinci, *Nutrient Agar* (NA), medium produksi protease, Tris-HCl, TCA, Na_2CO_3 , KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kasein, glukosa, maltosa, sukrosa, laktosa, folin ciocalteu, tirosin, akuades, dan alkohol.

Tahapan Penelitian

a. Sumber isolat bakteri

Isolat yang digunakan pada penelitian ini yaitu TUA-504 koleksi isolat bakteri termofilik Laboratorium Bioteknologi, UPT Biota Sumatera, Universitas Andalas. Isolat bakteri termofilik tersebut diisolasi dari sumber air Sungai Medang, Kabupaten Kerinci. Kemudian isolat bakteri TUA-504 diremajakan pada medium *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasikan dalam inkubator dengan suhu 50°C selama 24 jam.

b. Optimasi variasi sumber karbon

Disiapkan inokulum menggunakan medium produksi protease. Dipipetkan 5 mL inokulum pada medium produksi protease yang ditambahkan dengan variasi sumber karbon yaitu, glukosa, sukrosa, laktosa dan maltosa dengan konsentrasi masing-masing 1%. Medium produksi diinkubasi pada kondisi optimum yang telah didapatkan dan dicuplik pada waktu idiofase. Kemudian, medium produksi disentrifugasi pada 6000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh larutan enzim dan ditentukan aktivitas enzim (Agustien, 2010).

c. Optimasi variasi sumber nitrogen

Setelah didapatkan kondisi optimum sumber karbon, kemudian dilanjutkan mengoptimasi sumber nitrogen. Disiapkan inokulum menggunakan medium produksi protease. Dipipetkan masing-masing 5 mL inokulum pada medium produksi protease yang ditambahkan dengan variasi sumber nitrogen yaitu KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan konsentrasi masing-masing 1%. Medium produksi diinkubasi pada kondisi optimum yang telah didapatkan dan dicuplik pada waktu idiofase. Selanjutnya, medium produksi disentrifugasi pada 6000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh larutan enzim dan ditentukan aktivitas enzim (Agustien, 2010).

d. Pengujian aktivitas protease

Pengujian aktivitas protease dilakukan dengan metode Takami et al. (1989) dimulai dengan membuat substrat kasein 1%, larutan substrat kemudian dipipetkan sebanyak 0,5 mL,

selanjutnya ditambahkan larutan enzim sebanyak 0,5 mL, ditambahkan 0,25 Tris-HCL buffer 50mM pH 8,0 diinkubasi (60°C, 15 menit). Ditambahkan 0,5 mL TCA diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Disentrifugasi pada (6000 rpm, 20 menit), lalu supernatan (0,375 mL) dan dipindahkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 1,25 mL Na₂CO₃ dan 0,25 mL 1N Folin Cioceltea. Pembacaan OD dilakukan pada λ 578 nm. Penentuan nilai blanko dilakukan dengan 0,5 mL akuades. Penentuan nilai standar dilakukan dengan 0,5 mL sampel protease diganti dengan 0,5 mL tirosin 5 mM.

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

Keterangan:

UA = Unit Aktivitas Protease (U/mL)

Asp = Absorbansi sampel

Abl = Absorbansi blanko

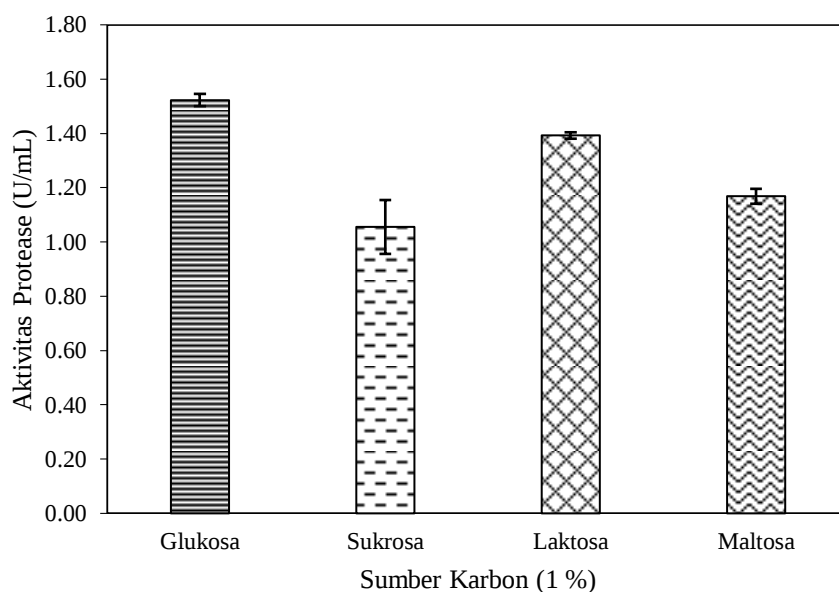
Ast = Absorbansi standar

T = Waktu inkubasi (menit)

P = Pengenceran

III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

a. Aktivitas enzim protease terhadap variasi sumber karbon

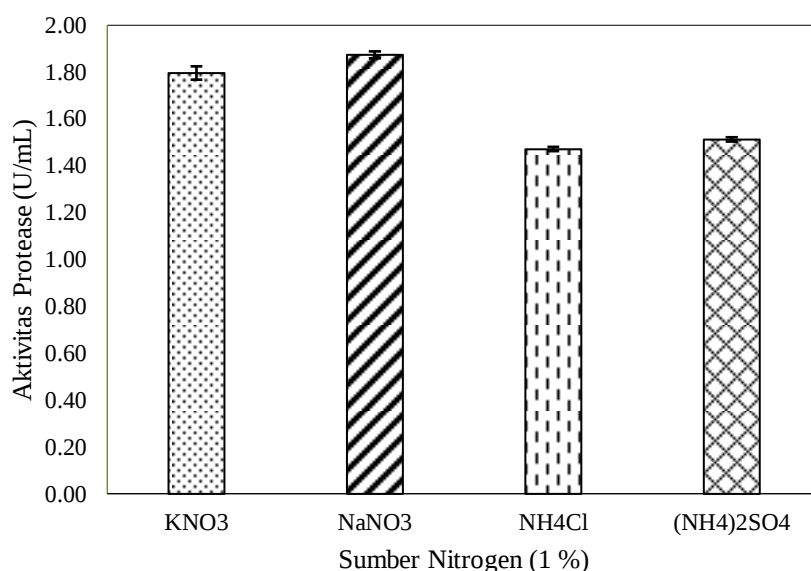


Gambar 1. Aktivitas protease dari isolat bakteri termofilik TUA-504 dengan variasi sumber karbon konsentrasi 1%

Gambar 1. menunjukkan aktivitas protease dari optimasi menggunakan beberapa sumber karbon yaitu glukosa, sukrosa, laktosa, dan maltosa masing-masing dengan konsentrasi 1% dihasilkan nilai aktivitas spesifik protease yang berbeda-beda oleh isolat bakteri termofilik TUA-504. Diantara keempat jenis sumber karbon yang diberikan, glukosa memiliki nilai aktivitas spesifik protease yang tertinggi dengan nilai aktivitas 2,675 U/mg. Glukosa menjadi sumber karbon terbaik disebabkan karena glukosa dapat menghasilkan energi yang cukup dan memicu ekspresi gen-gen yang terlibat pada proses biosintesis serta sekresi enzim dalam meningkatkan aktivitas protease (Jingying dan Yan, 2023). Kemampuan suatu organisme untuk memecah karbohidrat yang berbeda dapat disebabkan oleh preferensi mikroorganisme terhadap lingkungan yang rendah kandungan organiknya.

Hal ini dukung oleh Suberu et al. (2019), bahwa secara umum perbedaan sumber karbon akan memiliki pengaruh yang berbeda dalam memproduksi enzim ekstraseluler. Produksi enzim ini diatur oleh mekanisme fisiologis dan katabolit glukosa (represi glukosa) dalam cairan medium kultur. Aktivitas protease mengalami penurunan pada glukosa disakarida. Hal ini disebabkan karena terjadinya represi katabolit serta memicu jalur regulasi yang dapat menekan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam metabolisme produksi enzim. Represi katabolit karbon (CCR) adalah mekanisme pengaturan yang mencegah ekspresi gen yang diperlukan untuk pemanfaatan sumber karbon sekunder seperti maltosa, sukrosa dan laktosa dengan adanya substrat yang disukai (Stulke dan wolfgang, 1999).

b. Aktivitas enzim protease terhadap variasi sumber nitrogen



Gambar 2. Aktivitas protease dari isolat bakteri termofilik TUA-504 dengan variasi sumber nitrogen konsentrasi 1%

Gambar 2. menunjukkan bahwa aktivitas enzim isolat bakteri mengalami peningkatan yang signifikan pada penambahan sumber nitrogen berupa kalium nitrat (KNO₃) 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 KNO₃ ke dalam medium kultur *Bacillus* sp. S5 dapat meningkatkan aktivitas enzim selulase. Penelitian lain oleh Abdollahi et al., (2021) menunjukkan bahwa penambahan KNO₃ ke dalam medium kultur *Bacillus amyloliquefaciens* dapat meningkatkan produksi enzim protease dan amilase. Penambahan KNO₃ dapat meningkatkan aktivitas protease karena dapat menyediakan nitrat (NO₃) 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. Dalam jalur metabolisme ini, nitrat diubah menjadi amonium (NH₄⁺) melalui reduksi nitrat yang melibatkan enzim seperti nitrat reduktase. Amonium selanjutnya dapat digunakan untuk sintesis protein, termasuk sintesis enzim protease. KNO₃ mengandung nitrat yang mudah diakses oleh bakteri. Ketika KNO₃ ditambahkan ke media pertumbuhan, bakteri yang memiliki jalur metabolisme nitrat akan menggunakan NO₃ dari

KNO₃ untuk sintesis protein. Keberadaan nitrat yang melimpah dalam media memberikan sumber nitrogen yang cukup untuk pembentukan enzim protease.

IV. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian tersebut yaitu didapatkan kondisi optimum isolat bakteri termofilik TUA-504 dalam memproduksi enzim protease yaitu pada sumber karbon glukosa dan sumber nitrogen NaNO₃ dan peningkatan aktivitas protease sebelum dan sesudah optimasi mencapai 78%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdollahi, P., Ghane, M., & Babaeekhou, L. (2021). Isolation and characterization of Thermophilic bacteria from Gavmesh Goli hot spring in Sabalan geothermal field, Iran: Thermomonas hydrothermalis and Bacillus altitudinis isolates as a potential source of Thermostable Protease. *Geomicrobiology Journal*, 38(1), 87-95.
- Adelere, I. A., & Lateef, A. (2019). Degradation of keratin biomass by different microorganisms. *Keratin as a Protein Biopolymer: Extraction from Waste Biomass and Applications*, 123-162.
- Agustien, A. 2010. *Protease Bakteri Termofilik*. UNPAD Press. Bandung.
- 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.
- Agustien, A., W. Cahyati, and Y. Rilda, “Exploration and Characterization of Thermophilic Bacteria from the Kerinci-Jambi Geothermal Source for Alcohol Production,” *Online J Biol Sci*, vol. 24, no. 3, pp. 313–320, 2024, doi: 10.3844/ojbsci.2024.313.320.
- 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.
- Dutta, S., Y.S. Park & K. Park. 2016. Proteolytic Activity of Thermophilic *Bacillus licheniformis* strain SF5-1 for the Efficient Bioconversion of Pork Waste to Amino Acid Fertiliser. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 111: 31-36.
- Fachrial, E., V. Krisdianilo, Harmileni, I.N.E. Lister, T.T. Nugroho & Saryono. 2021. Isolation, Characterization, Activity Test and Molecular Identification of Thermophilic Bacteria Producing Proteases from Dolok Tinggi Raja Natural Hot Springs, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas* 22: 1725-1732.
- Jingying, C. & G. Yan. 2023. Optimization of Fermentation Conditions for Protease Production from *Bacillus subtilis*. *BIO Web of Conferences* 59.
- Kurniawan, H.M., R. Fikrinnisa & A. Adriadi. 2022. Optimasi Ekstrinsik Produksi Protease dari *Bacillus* sp. TG-50 Isolat Tanah Tempat Pembuangan Akhir Sampah (TPAS) Talang Gulo Jambi. *Jurnal Penelitian Biologi (Journal of Biological Research)* 9(1): 1-14.
- Naveed, M., F. Nadeem, T. Mehmood, M. Bilal, A. Zahid, A. Fazeha. 2021. Protease-A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catalysis Letter* 151: 307-323.
- Ramadhan, D., F. Firdayani, N. Karimah, E. E. Permadi, S. El Muttaqien, and A. Supriyono, “Identification of potential bioactive compounds from *Azadirachta indica* (Neem) as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: Molecular docking and molecular dynamics

- simulation studies,” J Appl Pharm Sci, vol. 13, no. 11, 2023, doi: 10.7324/JAPS.2023.139799.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110.
- Si, J.B., E.J. Jang, D. Charalampopoulos & Y.J. Wee. 2018. Purification and Characterization of Microbial Protease Produced Extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 23:176-182.
- Stülke, J., & Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 195-201.
- Suberu, Y., I. Akande, T. Samuel. A. Lawal & A. Olaniran. 2019. Optimization of Protease Production in Indigenous *Bacillus* sp. Isolated from Soil Samples in Lagos, Nigeria using Response Surface Methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18: 1-13.
- Takami, H., T. Akiba & K. Horikosh. 1989. Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. AH-101. *Applied Microbiol Biotechnol* 30: 120-124.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
10 Juni 2024	17 Juni 2024	27 Juni 2024	Ya