

Produksi Protease Alkalis Termostabil Dari *Aspergillus flavus* DUCC- K225 Dengan Ammonium Sulfat Sebagai Sumber Nitrogen

Production of Thermostable Alkaline Proteases from *Aspergillus flavus* DUCC-K225 With Ammonium Sulfate For Nitrogen Source

Mohammad Affan Dwica Putra, Isworo Rukmi, Sri Pujiyanto dan Nies S. Mulyani

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl Prof. H. Soedarto, S.H., Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275
Affan.dwica@gmail.com

Abstract

Protease is a protein hydrolytic enzyme which can be generated by a variety of microorganisms, including mold. *Aspergillus flavus* K225, DUCC is indigenous mold isolated from lime soil of Madura which is have potential as a alkaline protease producer. This research aims was to know the effect of ammonium sulfate as nitrogen source for the production of protease enzymes by *Aspergillus flavus* DUCC-K225. The production of alkaline protease were conducted in submerged culture medium with agitation. Fermentation medium used was modification Czapeks Dox Broth containing 2% casein. Incubation is carried out for 7 days. The results showed that ammonium sulfate is a good source of nitrogen for growth and production of alkaline protease enzyme, which is demonstrated by higher dry weight, the protease activity, the protein content and the specific activities, comparing those on standard medium using sodium nitrate as N source.

Kata kunci: *alkaline protease ; Aspergillus flavus ; nitrogen ; ammonium sulfat ; natrium nitrate.*

Abstrak

Enzim protease merupakan enzim hidrolase protein yang dapat dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme, salah satunya adalah kapang. *Aspergillus flavus* DUCC K225, merupakan isolate kapang indigenous dari tanah kapur Madura yang mempunyai potensi sebagai penghasil enzim protease alkalis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen untuk produksi enzim protease oleh *Aspergillus flavus* DUCC-K225. Produksi protease alkalis dilakukan dengan teknik kultur terendam teragitasi pada medium modifikasi Czapeks Dox Broth yang mengandung 2% casein. Inkubasi dilakukan selama 7 hari. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa amonium sulfat merupakan sumber nitrogen yang baik, bagi pertumbuhan dan produksi enzim protease alkalis, yang ditunjukkan dengan berat kering, aktivitas protease, kadar protein dan aktivitas spesifik yang lebih tinggi dibandingkan hasil pada medium standar yang menggunakan natrium nitrat sebagai sumber N..

Key word: *protease alkalis ; Aspergillus flavus DUCC-K225 ; nitrogen, ammonium sulfat ; natrium nitrat*

PENDAHULUAN

Protease adalah enzim hidrolase yang memecah senyawa protein melalui reaksi hidrolisis menjadi bentuk molekul yang lebih sederhana, seperti asam amino atau oligopeptida pendek. Dalam dunia industry, protease merupakan enzim penting yang telah dimanfaatkan secara luas, diantaranya dalam produksi detergen, penyamakan kulit, tekstil, makanan, farmasi, hidrolisat protein,

serta dimanfaatkan pula untuk pengolahan limbah industri (Nascimento dan Martins, 2004 dalam Ahmed, *et. al.*, 2008). Persentase penggunaan enzim protease dalam dunia industri saat ini mencapai 65-70% dari keseluruhan enzim yang dimanfaatkan untuk kebutuhan komersil dunia (Huang, *et al.*, 2006). Kebutuhan dunia akan enzim protease dewasa ini semakin meningkat, dengan semakin bervariasinya proses hidrolisis protein baik

dalam skala industri maupun rumah tangga, antara lain penggunaan pH yang tinggi dan suhu yang melebihi suhu kamar. Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan penggunaan enzim protease alkalis termotoleran. Enzim protease dapat dihasilkan oleh berbagai jenis organisme, termasuk bakteri dan kapang. Eksplorasi kapang penghasil protease alkalis telah dilakukan oleh beberapa peneliti, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kemampuan menghasilkan protease tertinggi ditemukan pada genus *Aspergillus*, antara lain *A. niger*, *A. flavus* and *A. oryzae*, dll. merupakan kapang penghasil protease alkalis (Preetha, 2012). Hasil eksplorasi kapang penghasil protease alkalis dari tanah kapur di daerah Sukolilo Barat Madura yang dilakukan oleh Rukmi, dkk. (2014), berhasil mendapatkan isolat *Aspergillus flavus* DUCC K225 yang potensial menghasilkan protease alkalis, dengan aktivitas spesifik 0,1747 U/mg (Gambar 1). Ketersediaan nitrogen sebagai salah satu unsur kimia penyusun protein di dalam medium fermentasi sangat penting, bagi pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme, yang juga berarti mempengaruhi produksi enzim. Produksi protease alkalis dari beberapa *Aspergillus* sp. yang telah dilakukan umumnya menggunakan medium modifikasi Czapeks Dox Broth yang mengandung 2% kasein (Charles *et al.*, 2008; Coral *et al.*, 2003). Pada penelitian ini digunakan amonium sulfat untuk menggantikan natrium nitrat sebagai sumber nitrogen.



Gambar 1. Aktivitas proteolitik alkalis dari *A. flavus* DUCC K225 (Rukmi, 2014)

BAHAN DAN METODE

Pemeliharaan *A. flavus* DUCC-K225

Isolat *Aspergillus flavus* DUCC-K225 ditumbuhkan pada medium miring PDA selama 7

hari pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$, dan disimpan dalam lemari es sampai saat digunakan.

Pembuatan Inokulum (Charles *et al.*, 2008)

Ke dalam biakan *A. flavus* DUCC-K225 berumur 7 hari ditambahkan 5 ml larutan 0,1% Tween 80 steril, spora dilepaskan secara hati-hati, suspensi spora yang terbentuk di tentukan konsentrasinya sampai $10^8/\text{ml}$.

Produksi enzim (Charles *et al.*, 2008; Coral *et al.*, 2003)

Produksi enzim protease alkalis dilakukan dengan menginokulasikan suspensi spora *A. flavus* DUCC-K225 ($10^8/\text{mL}$) sebanyak 1% (v/v) ke dalam 100 ml medium produksi yang mengandung (g/L) Sukrosa 30; KCl 0.5; FeSO_4 0.01; MgSO_4 0.5; K_2HPO_4 , 1.0; NaNO_3 , 2.0 2% kasein (w/v) dan 0,25 ppm kloramfenikol. pH medium diatur sampai 8.5 dengan penambahan NaOH. Pada medium perlakuan NaNO_3 digantikan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C di atas 'rotary shaker' pada 120 rpm selama 7 hari.

Pemanenan enzim

Kultur *A. flavus* DUCC-K225 yang telah diinkubasi disaring dengan menggunakan kain kasa untuk memisahkan propagule miselium, selanjutnya disaring kembali dengan kertas saaring Whatman No. 1. Filtrat selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Supernatan yang diperoleh merupakan enzim protease kasar. Miselium kapang yang dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C sampai tercapai berat yang konstan.

Aktivitas Protease (Charles, *et al.*, 2008),

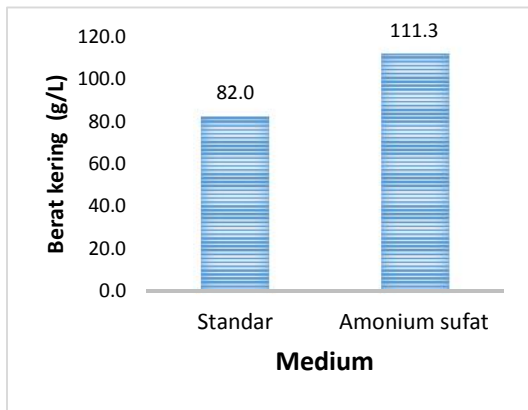
Sampel enzim kasar diambil 1 mL dan ditambahkan ke dalam 1 mL kasein 2% (dalam buffer Tris HCl 0,1 M, pH 8,6), campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, reaksi dihentikan dengan penambahan 2 ml Trichloroacetic acid 0,4 M, dan diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu 37°C . Larutan selanjutnya disaring menggunakan kertas Whatman no 1. Sejumlah 1 ml filtrat ditambah dengan 5 mL Na_2CO_3 0,4 M dan 0,5 mL folin fenol 0,5 M dicampur homogen, diinkubasi pada 37°C selama 20 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang (λ) 660 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μmol tyrosine dalam waktu 20 menit, pada suhu 37°C .

Kadar Protein

Kadar protein enzim kasar diukur dengan metode Lowry, dengan menggunakan standar Bovine Serum Albumine (Devi *et al.*, 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nitrogen merupakan makronutrient bagi berbagai makhluk hidup, termasuk kapang. Kandungan senyawa nitrogen di dalam suatu medium akan sangat mempengaruhi pertumbuhan. Pertumbuhan miselium *A. flavus* DUCC K225 pada medium dengan sumber N ammonium sulfat, ternyata lebih baik dibandingkan dengan medium standar yang mengandung natrium nitrat sebagai sumber N (Gambar 1.). Menurut Speight (2002), ammonium sulfat merupakan jenis senyawa anorganik yang terdiri dari unsur sulfur (24% berat) dalam bentuk ion sulfat dan unsur nitrogen (21% berat) dalam bentuk ion ammonium. Metabolisme natrium nitrat menjadi amonium syang merupakan salah satu prekursor asam amino penyusun protein, terjadi melalui proses kimiawi yang lebih panjang dibandingkan dengan metabolisme amonium sulfat.

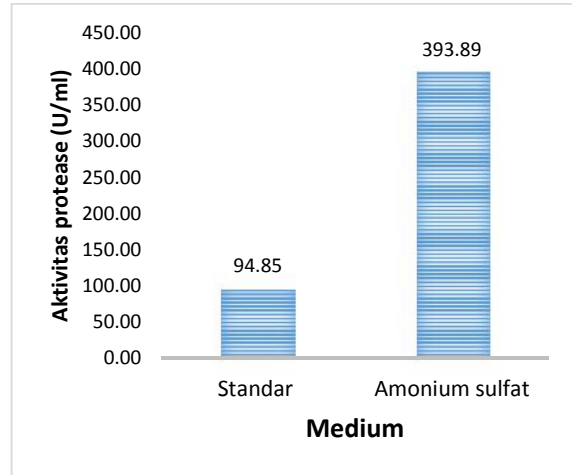


Gambar 2. Berat kering miselium *A. flavus* DUCC K225 pada medium produksi inkubasi 7 hari.

Disamping itu sulfat mengandung unsur S, yang diperlukan sebagai prekursor asam amino yang mengandung sulfur, misalnya metionin dan sistein.

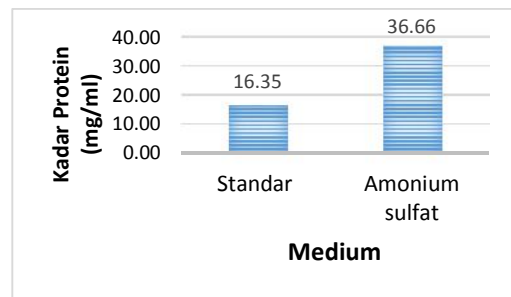
Ito dan Reshi (2014) menyatakan bahwa untuk beberapa kapang, medium yang mengandung nitrogen dalam bentuk amonium, memberikan pertumbuhan miselium yang lebih baik dibandingkan dengan nitrogen dalam bentuk nitrat.

Produksi enzim protease pada medium dengan pH 9, dapat digolongkan sebagai protease alkali.



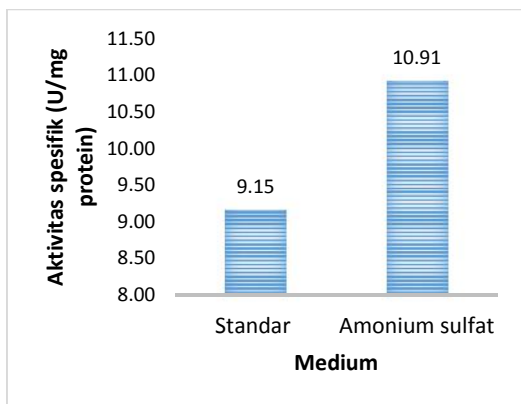
Gambar 3. Aktivitas protease *A. flavus* DUCC K225 pada medium standar dan medium amonium sulfat, inkubasi 7 hari

Produksi protease dari *A. flavus* DUCC-K225 pada media ammonium sulfat menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan pada medium standar (Gambar 2). Produksi protease dapat diamati melalui aktivitas enzim dari enzim kasar. Hasil ini sesuai dengan penelitian Devi *et al.* (2008) yang menemukan bahwa produksi protease alkalis tertinggi dari *A. niger* terjadi pada medium dengan sumber N amonium sulfat.



Gambar 4. Kadar protein *A. flavus* DUCC K225 pada medium standar dan medium amonium sulfat, inkubasi 7 hari

Kadar protein pada ensim kasar yang dihasilkan pada medium amonium sulfat lebih tinggi dibandingkan pada medium standar yang mengandung natrium nitrat sebagai sumber N (Gambar 3). Kadar protein yang dihasilkan cukup banyak dipengaruhi oleh kandungan nutrisi khususnya unsur nitrogen, yang tersedia dalam medium fermentasi. Ion amonium lebih mudah digunakan untuk sintesis protein, dibandingkan dengan ion nitrat. Menurut Kavanagh (2005) pada umumnya jamur akan menggunakan ion nitrat pada medium sebagai sumber N, setelah mengubahnya menjadi amonium melalui proses reduksi dengan melibatkan enzim nitrat dan nitrit reduktase. Ammonium kemudian akan diasimilasi menjadi senyawa glutamate dan glutamin. Kedua senyawa tersebut berperan dalam metabolisme seluler (baik primer maupun sekunder), termasuk produksi protein enzim.



Gambar 5. Aktivitas spesifik *A. flavus* DUCC K225 pada medium standar dan medium amonium sulfat, inkubasi 7 hari

Nilai aktivitas spesifik suatu ensim menunjukkan tingkat kemurnian ensim tersebut, aktivitas spesifik dihitung dengan cara membagi aktivitas enzim (U/mL) dengan kadar protein (mg/mL), sehingga diperoleh nilai aktivitas spesifik dengan satuan U/mg (Ketnawa *et al.* (2009). Gambar 4. menunjukkan nilai aktivitas spesifik protease alkalis *A. flavus* DUCC-K225 pada medium ammonium sulfat lebih tinggi dibandingkan pada medium standar yang mengandung natrium nitrat sebagai sumber N.

Seluruh hasil pengamatan menunjukkan

bahwa amonium sulfat merupakan sumber nitrogen yang lebih baik dibandingkan natrium nitrat, untuk produksi protease alkalis dari *A. flavus* DUCC K225.

KESIMPULAN

Penggunaan amonium sulfat dalam medium produksi meningkatkan pertumbuhan dan protease alkalis *A. flavus* DUCC K225.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, yang telah mendanai penelitian ini melalui kontrak No.343-30/UN7.5.1/PP/2017

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S. A. et al., 2008. Optimization, Immobilization of Extracellular Alkaline Protease and Characterization of its Enzymatic Properties. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5), pp. 434-446..
- Anandan,D., W.N. Marmer & R.L. Dudley. 2007. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2007) 34:339–347.
- Charles, P., V. Devanathan, P. Anbu, M.N. Ponnuswamy. P. T. Kalaichelvan & Byung-Ki Hur. 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J. Bas. Microbiol.* 2008, 48, 347–352.
- Coral,G., B. Arian, M.N. Unaldi & H. Guvenmez. 2003. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Ann. Microbiol.*, 53 (4), 491-498
- Devi, M.K., A. R. Banu, G.R. Gnanaprabhal, B.V. Pradeep & M. Palaniswamy, 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Ind. J. Sci. Technol.* 1 (7): 1-6
- Fujinami, S & Fujisawa M, 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their

- enzymes--past, present and future. *Environ.Technol.*31(8-9):845-56
- Hossain, MD.T., F. Das, L.W. Marzan, M.D. S. Rahman & M.N. Anwari. 2006. Some Properties of Protease of the Fungal Strain *Aspergillus flavus* . *Int. J. Agric. Biol.* 2006/08–2–162–164
- Illanes, A., 2008. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Khan, F. 2013. New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innov. Res. Chem.* 1:1 (2013) 1-6
- Kladwang, W. , A. B200humirattana & and N. Hywel-Jones. 3. Alkalisne-tolerant fungi from Thailand . *Fungal Diversity* 13: 69-83.
- Mikhailova, R.V. 2011. Proteolytic enzymes from mycelial fungi 3/2011 :47-61
- Preetha, P. 2012. Comparative study on production of the alkalisne protease enzyme from free and immobilized mycelia of *Aspergillus Niger* and *Aspergillus Flavus*,*Discovery life* 1(1), 18-25. www.discovery.org.in/dl.htm
- Pundir R.K., S. Rana and H. Tyagi. 2012. Studies on Compatibility of Fungal Alkalisne Protease with Commercially Available Detergents . *Int. J. Mod. Biochem.*, 1(1): 41-56.
- Rani,R.M., N.N.Prasad and K.R.S.Sambasivarao. 2012. Optimization of Cultural Conditions for the Production of Alkalisne Protease from a Mutant *Aspergillus Flavus* AS2. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 3(3): 565-576
- , Prasad N.N., 2013. Studies on Purification of Alkaline Protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS2. *Res. J. Biotechnol.* 8 (3):58-66
- Rukmi,I., Wuryanti & A. Trilungani. 2014a. Eksplorasi dan Karakterisasi jamur alkalofilik termotoleran dari tanah kapur di Desa Sukolilo Barat Madura sebagai penghasil protease alkalis untuk Industri. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. BPOPTN- Universitas Diponegoro. No. DIPA-023.04.02.189185/2014.
- , 2014b. Alkalophilic protease activity of Black *Aspergilli* isolated from soil of West Sukolilo Madura. Proceeding of 9th Join Conference on Chemistry. Semarang , 12-14 Nopember 2014.
- Sahib,A. 2009. Study of Optimum Condition for alkaline protease production from local isolate of *Aspergillus niger*. *Iraqi J. Sci.*, 50(4): 476 - 481
- Sangmuang, S. 2010. Purification and characterization produce by the thermofilik protease fungus *Aspergillus fumigatus* SS0509. Thesis Master of Science. Silpakorn University. Bangkok. Thailand.
- Sharma, N. & K. Dee. 2011. Production, purification and crystallization of an alkalisne protease from *Aspergillus tamari* [EF661565.1]. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 2011, 2(7): 1135-1142.
- Sankheerthana, C., S. Pinjar, R.T. Jambagi, S. Bhavimani, S. Anupama, B. Sarovar & S.R. Inamdar. 2013. Production and Partial Characterization of Protease from *Aspergillus flavus* using Rice Mill Waste as a Substrate and its Comparison with *Aspergillus niger* Protease. Proceeding of National Conference on “Woman Science & Engineering. Dharwat. India. pp. 143-147 (<http://inpresco.com/category/ijcet>).
- Lowry, O. H., Rosenberg, N. I., Farr, A. L. & Randall, R. J., 1951. protein measurement with the Folin-phenol reagents. *journal of biochem.*, Volume 193, pp. 265-275.
- Martins , M. & Nascimento, W., 2006. Studies On Stability Of Protease Brazilia *Microbiol.* Volume 37, pp. 307-311.
- NOPapagiani, M., 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advanced*, Volume 22, pp. 189-259.
- Poliana , J. & MacCabe, A. P., 2007. Industrial Enzymes: Structure, Function, and Applications. Dordrecht: Springer, p. 174.
- Speight, J., 2002. Chemical Process and Design Handbook. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Walker, G.M. and N.A. White. 2005. Introduction to Fungal Physiology *In* Kavanagh, K. (ed). *Fungi : Biology and Application*. John Wiley & Sons, Ltd.. pp. 1-35