

**PENGARUH SUMBER KARBON DAN NITROGEN TERHADAP PRODUKSI PROTEASE
ALKALI DARI *Bacillus* sp. M_{1.2.3} TERMOFILIK**

Rozana Zuhri, Anthoni Agustien Dan Yetria Rilda

Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, Padang

E-mail: zhue_rieismak@yahoo.com

ABSTRACT

This research looked the effect of carbon and nitrogen sources on the production of alkaline protease from *Bacillus* sp. M_{1.2.3}. *Bacillus* sp. M_{1.2.3} thermophilic as a source of alkaline proteases taken from Sungai Medang hot springs Kerinci, Jambi. Measurement of alkaline protease activity was determined by a modified method of Ward. While the protein content determined by the method of Lowry. The results of this research indicate that 1% starch and ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) 1% is a source of carbon and inorganic nitrogen to produce the best alkaline protease.

Keywords: Carbon sources, nitrogen sources, alkaline protease and *Bacillus* sp. M_{1.2.3}

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh sumber karbon dan nitrogen terhadap produksi protease alkali dari *Bacillus* sp. M_{1.2.3}. Isolat M_{1.2.3} termofilik berasal dari sumber air panas Sungai Medang Kerinci, Jambi. Pengukuran aktifitas protease alkali menggunakan metode Ward. Sedangkan protein menggunakan metode Lowry. Hasil penelitian diperoleh Sumber karbon yang memberikan hasil terbaik terhadap produksi protease alkali adalah amilum 1% dengan Sumber nitrogen ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) 1%.

Kata kunci: Sumber karbon, Sumber nitrogen, protease alkali, *Bacillus* sp. M_{1.2.3}

PENDAHULUAN

Perkembangan industri enzim semakin pesat dan menempati posisi penting di bidang industri. Hal ini disebabkan karena enzim memiliki sifat yang efisien, selektif, mengkatalis reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan (Fuad *et al*, 2004). Salah satu diantaranya adalah enzim protease.

Aplikasi enzim dalam bioteknologi memerlukan enzim yang tahan terhadap suhu tinggi, sehingga akan meningkatkan penggunaan bakteri termofilik (Suhartono, 1989). Bakteri *Bacillus* mendapat perhatian utama karena relatif mudah untuk isolasi dari berbagai macam lingkungan dan mampu tumbuh dalam media sintetik. (Johnvesly dan Naik, 2001). *Bacillus* sp. M_{1,2,3} merupakan salah satu bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan protease alkali dari sumber air panas yang bersifat basa dari Sungai Medang Kabupaten Kerinci, Jambi. *Bacillus* sp. M_{1,2,3} hidup pada kisaran suhu 50°-78 °C dan pH 8,45-8,71. Menurut Cowan (1992) sumber air panas yang bersifat basa kaya akan mineral dan memiliki diversitas biota yang tinggi.

Upaya peningkatan produksi enzim dengan aktifitas yang tinggi memerlukan serangkaian optimasi, diantaranya penggunaan sumber karbon dan nitrogen. Sumber karbon dan nitrogen merupakan faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan produk mikroorganisme (Sumantha *et al*, 2006). Nitrogen sangat diperlukan untuk pertumbuhan sel, sedangkan unsur karbon digunakan untuk meningkatkan energi biosintesis (Aunstrup, 1979 dalam Naiola dan Widhyastuti, 2002). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh sumber karbon dan nitrogen terhadap produksi protease alkali dari *Bacillus* sp. M_{1,2,3} termofilik sumber air panas Sungai Medang Kerinci, Jambi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tahapan penelitian ini meliputi: penentuan sumber karbon yang terbaik dari tujuh sumber karbon gula sederhana (glukosa, maltosa, fruktosa, laktosa, sukrosa, xilosa, asam sitrat) dan 2 gula kompleks (amilum dan CMC). Penentuan sumber nitrogen terbaik dari empat sumber nitrogen: Kalium nitrat (KNO₃), Natrium nitrat (NaNO₃), Amonium klorida (NH₄Cl), amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄).

Alat yang digunakan: Reagen Folin ciocalteau's (Merck), Trichloro Acetic Acid (TCA) (Merck), L-Tirosin (Merck), Bovine Serum Albumin (Merck), glukosa (Merck), maltose (Merck), fruktosa (Ajax chemical), laktosa (Merck), sukrosa (Merck), xilosa (Sigmaultra), asam sitrat (Merck), amilum (Merck), CMC (Merck), KNO_3 (Merck), NaNO_3 (Merck), NH_4Cl (Merck), dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck). Bahan yang digunakan: erlenmeyer (Appox BGIF), mikropipet (Biohit), *autoclave* (Hirayama HV-25), vortex (Ika Genius 3), tabung eppendorf dan inkubator.

Efek sumber karbon dan nitrogen pada medium produksi enzim terhadap aktifitas spesifik enzim dilakukan dengan memodifikasi metode Agustien (2010). Isolasi enzim protease alkali dilakukan menurut metoda Susanti (2003). Pemisahan enzim protease dari sel dalam medium produksi dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan merupakan ekstrak kasar enzim protease. Pengukuran aktifitas enzim protease dilakukan dengan metode Bergmeyer dalam Ward (1984) dalam Sugioyono *et al.*, (2003) yang dimodifikasi, sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry dalam Sugioyono *et al.*, (2003). Aktifitas spesifik enzim protease dihitung dengan membandingkan rasio dari aktifitas protease (U/ml) terhadap kadar protein (mg/ml) (Sugioyono *et al.*, 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Sumber Karbon terhadap Aktifitas Protease Alkali

Sumber karbon berpengaruh nyata terhadap aktifitas protease alkali (Tabel 1).

Tabel 1. Rata-rata Aktifitas Protease Alkali dari Sumber Karbon yang Berbeda

Sumber Karbon	Aktifitas Protease Alkali (U/ml)
Xilosa	0,001 ^a
Fruktosa	0,004 ^a
Kontrol	0,006 ^{abc}
Maltosa	0,012 ^{abc}
Glukosa	0,014 ^{abc}
Laktosa	0,022 ^{abc}
Sukrosa	0,051 ^{abc}
CMC	0,074 ^{bc}
Asam Sitrat	0,078 ^c
Amilum	0,131 ^d

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DNMRT

Tabel 1 menunjukkan bahwa sumber karbon tertinggi yang digunakan untuk produksi protease alkali isolat *Bacillus* sp. M_{1.2.3} menggunakan amilum dengan aktifitas protease tertinggi sebesar 0,131 U/ml yang berbeda nyata dengan kontrol dan perlakuan lainnya. Sedangkan Xilosa memiliki aktifitas protease alkali terendah sebesar 0,001 U/ml. Hal ini disebabkan oleh pemecahan amilum menjadi glukosa dalam sel *Bacillus* sp. M_{1.2.3} menghasilkan energi untuk aktifitas yang akan menghasilkan protease alkali. Selain itu, pada sel *Bacillus* sp. M_{1.2.3} terjadi peristiwa represi katabolit yaitu sel *Bacillus* sp. M_{1.2.3} mampu menghasilkan enzim untuk metabolis gula selain glukosa, sehingga sel tidak dapat menghasilkan protease alkali jika terdapat glukosa. Menurut Marks *et al.*, (2000), glukosa mempengaruhi kadar AMP siklik (*cyclic AMP*, cAMP) di dalam sel. Protease alkali yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. M_{1.2.3} akan tersekresi keluar sel dan akan terakumulasi. Menurut Rahman *et al.*, (2003) pertumbuhan mikroba akan meningkat jika karbohidrat ada dalam kultur media. Trismilah dan Sumaryanto (2005) unsur karbon dapat meningkatkan energi dan biosintesis sehingga persediaan sumber karbon yang cukup perlu untuk fermentasi.

Menurut Silva *et al.*, (2007) yaitu sumber karbon terbaik untuk meningkatkan produksi protease pada *Bacillus substilis* adalah amilum sedangkan glukosa tidak bisa meningkatkan produksi protease yang dihasilkan oleh *Bacillus substilis*. Johnvesley and Naik (2001) juga melaporkan amilum dan asam sitrat sebagai sumber karbon terbaik pada *Bacillus* sp. JB-99 dan penambahan 1% glukosa sebagai sumber karbon dapat menekan sintesis protease. Tetapi lain halnya yang dilaporkan oleh Agustien (2010) *Brevibacillus* AGRI A-03 termofilik yang berasal dari sumber air panas Rimbo Panti Sumatera Barat memproduksi protease alkali paling baik dengan kondisi glukosa 1%.

Pengaruh Sumber Nitrogen Anorganik terhadap Aktifitas Protease Alkali

Sumber nitrogen berpengaruh nyata terhadap aktifitas protease alkali. Hasil pengamatan sumber nitrogen terhadap aktifitas protease alkali dapat dilihat pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan sumber nitrogen terbaik adalah amonium sulfat ((NH)₄SO₄) yang berbeda nyata dengan perlakuan jenis sumber nitrogen anorganik lainnya dengan aktifitas protease alkali sebesar 0,551 U/ml. Sedangkan aktifitas protease alkali terendah pada perlakuan tanpa penambahan sumber nitrogen yaitu sebesar 0,003 U/ml. Amonium sulfat ((NH)₄SO₄) merupakan sumber nitrogen anorganik yang diperlukan oleh *Bacillus* sp M_{1.2.3} untuk meningkatkan aktifitas bakteri

dalam medium produksi yang akan memberikan kecepatan eksponensial pertumbuhan sehingga meningkatkan produksi protease alkali. Sumber nitrogen digunakan mikroorganisme untuk mempercepat pertumbuhan sel dalam fermentasi (Trismilah dan Sumaryanto, 2005).

Tabel 2. Rata-rata Aktifitas Protease Alkali dari Sumber Nitrogen Anorganik yang berbeda

Sumber Nitrogen	Aktifitas Protease Alkali (U/ml)
Kontrol	0,003 ^a
KNO ₃	0,034 ^a
NH ₄ Cl	0,042 ^a
NaNO ₃	0,061 ^a
(NH) ₄ SO ₄	0,551 ^b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DNMRT

Sumber nitrogen biasanya diperlukan untuk produksi protease alkali, kenyataannya kebutuhan sumber nitrogen yang spesifik akan berbeda untuk setiap jenis mikroorganisme ataupun untuk mikroorganisme yang sama tetapi dari sumber yang berbeda (Kumar and Takagi, 1999). Sinha and Satyanarayana (1991) melaporkan sumber nitrogen anorganik yang terbaik untuk meningkatkan produksi protease alkali pada *Bacillus licheniformis* adalah amonium sulfat dan potasium nitrat. Hal yang sama dilaporkan oleh Heineken (1971) dalam Jhonvesly and Naik (2001) yaitu tingginya produksi protease alkali oleh *Bacillus sp.* pada medium yang mengandung glukosa dan amonium sulfat 1% sebesar 9010 U/ml. Sedangkan yang dilaporkan oleh Kurniawan (2011) pemberian sumber nitrogen KNO₃ dengan rasio C/N=10 pada medium mampu menghasilkan aktifitas protease paling tinggi dengan nilai 3,196 U/ml yang diproduksi dari bakteri sumber air panas Semurup Jambi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Variasi penggunaan sumber karbon berpengaruh signifikan pada taraf α 5% terhadap produksi protease alkali dari *Bacillus sp.* M_{1,2,3} termofilik sumber air panas Sungai Medang. Amilum merupakan sumber karbon terbaik produksi protease alkali yaitu sebesar 0,131 U/ml.

2. Sumber nitrogen memberikan pengaruh yang signifikan pada taraf α 5% terhadap produksi protease alkali dari *Bacillus sp.* M_{1,2,3} termofilik asal sumber air panas Sungai Medang. Sumber nitrogen yang memberikan hasil terbaik terhadap produksi protease alkali adalah ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) sebesar 0,551 U/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustien, A. 2010. Isolasi, Optimasi dan Amobilisasi *Brevibacillus agri* A-03 dari Sumber Air Panas Sumatera Barat Penghasil Protease Alkali dan Keratinase Termostabil Serta Aplikasinya. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung.
- Cowan, D.A. 1992. *Biochemistry and Molecular Biology of the Extremely Thermophilic Archaeobacteria*, in: *Molecular Biology and Biotechnology Extremophiles*. Ed. R.A. Herbert and R.J. Sharp, Blackie and Sons. New York.
- Fuad, A.M., R. Rahmawati dan N.R. Mubarik. 2004. Produksi dan karakterisasi persial protease alkali termostabil *Bacillus thermoglusidarius* AF-01. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 9 (1): 29-35. Bogor.
- Johnvesley, B and G.R. Naik. 2001. Study on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus sp.* JB99 in a Chemically Defined Medium. *Journal Process Biochemistry*. 37: 139-144.
- Kumar, C.G And H. Takagi. 1999. Microbial Alkaline proteases from bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advance*. 17: 561-594.
- Kurniawan, H.M. 2009. Isolasi Dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-Proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup, Kerinci, Jambi. *Tesis*. Universitas Andalas, Padang.
- Naiola, E dan N. Widhyastuti. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Protease dari beberapa isolat bakteri. *Berita Biologi*. 3 (6) : 467-473.
- Marks, D.B., A.D. Marks dan C.M. Smith. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar Sebuah Pendekatan Klinis*. EGC: Jakarta.
- Rahman, R.N.Z.R.A., M. Basri and A.B Saleh. 2003. Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus stearothermophilus* F1: Nutritional Factors Affecting Protease Production. *Annals of Microbiology*. 53: 199-210.
- Sinha, W dan T, Satyanarayana. 1991. Alkaline Protease by Thermophilic *Bacillus licheniformis*. *India, J-Microbial*. 31: 425-430.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB: Bogor.
- Sugioyono, R., A.J. Lintang dan R.A. Sabe. 2008. Karakterisasi Protease Bakteri Termofil Mata Air Laut Panas Poso Sulawesi Tengah. *Penelitian Perikanan II* (2). 156-162.
- Sumantha, A., C. Larroche and A. Pandey. 2006. Microbiology and industrial of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology Biotechnology* 44 (2): 211-220
- Susanti, E. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari *Bacillus subtilis* 1012M15. *Biodiversitas*. 4: 12-17.

Trismilah, S dan Sumaryanto. 2005. Pengaruh Kadar Nitrogen dalam media pada pembuatan protease menggunakan *Bacillus megaterium* DSM 319. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 3(1) : 9-12