

Produksi Enzim Protease Dari *A.niger* PAM18A dengan Variasi pH dan Waktu Inkubasi

Putri Ramadhani. MG. Isworo Rukmi. Sri Pujiyanto.
Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika.
Univertas Diponegoro, Semarang.
Jl. Prof. H. Sudarto, SH. Tembalang Telp. (024)7474754; Fax (024)76480690.
Email: pramadhany.bio@gmail.com.

ABSTRAK

Kemajuan dalam bidang teknologi fermentasi, rekayasa genetika, dan teknologi aplikasi enzim menyebabkan penggunaan enzim dalam industri semakin meningkat. Enzim yang digunakan dalam bidang industri dapat bersumber dari mikroorganisme seperti bakteri, kapang, dan khamir. Enzim Protease adalah salah satu enzim penting yang telah digunakan secara luas dalam aplikasi berbagai bidang industri dan merupakan 65% dari total penjualan enzim di dunia. Protease alkali merupakan salah satu kelompok enzim hidrolitik yang dapat mengkatalisis proses hidrolisis atau pemecahan protein menjadi asam amino penyusunnya dan bekerja pada kisaran pH netral hingga basa (7-12). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan waktu inkubasi terhadap produksi enzim protease dari *A.niger* PAM18A. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok, pola faktorial. Faktor yang pertama yaitu pH 7, 8, dan 9, sedangkan faktor kedua yaitu waktu inkubasi 5, 6, dan 7 hari. Hasil penelitian ini diperoleh bahwa pada kondisi pH medium 8 dan waktu inkubasi 5 hari, dapat menghasilkan enzim protease tertinggi dari kapang *A.niger* PAM18A dengan nilai aktivitas enzim protease sebesar 0,930 U/mL protein dan aktifitas spesifik sebesar 3,632 U/mg.

Kata Kunci : Produksi enzim, Protease, A. niger PAM18A, pH, waktu inkubasi

ABSTRACT

Advances in the field of fermentation technology, genetic engineering, and technology applications of enzymes lead to the use of enzymes in the industry is increasing. Enzymes used in the industry can be derived from microorganisms such as bacteria, molds, and yeasts. Protease is one of the important enzyme that has been used widely in various fields of industrial application and 65% of the sales of enzymes in the world. Alkaline protease is one of hydrolytic enzymes that can hydrolysis proteins which working at the pH range of 7-12. The aim of this study was to investigate the influence of pH and incubation time on the protease production of *A. niger* PAM 18A. The experimental were done using Factor Block Random Design with 2 i.e pH of 7, 8, 9, and incubation time of 5, 6, 7 days. The results showed that highest protease from *A. niger* PAM18A were found in the treatment of pH 8 and of 5 days incubating with the protease activity and specific activity were 0,930 U/mL and 3,632U/mg respectively.

Keywords: Production Enzyme, Protease, A. niger PAM18A, pH, incubation time.

PENDAHULUAN

Kemajuan dalam bidang teknologi fermentasi, rekayasa genetika, dan teknologi aplikasi enzim menyebabkan penggunaan enzim dalam industri semakin meningkat. Kesadaran

masyarakat yang semakin tinggi terhadap pencemaran lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri (Pandey & Singhana, 2008). Indonesia termasuk salah satu negara yang

memiliki keanekaragaman mikroorganisme yang melimpah, dimana mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan potensial yang cukup tinggi. Beberapa lokasi dengan kondisi lingkungan yang cukup ekstrim dapat menghasilkan mikroorganisme dengan sifat khusus (seperti *alkalophilic*). Untuk dapat tumbuh dan berkembang, mikroorganismenya memiliki sifat enzimatik dalam memecah substrat. Enzim yang digunakan dalam bidang industri dapat bersumber dari mikroorganisme seperti bakteri, kapang, dan khamir (Chutmanop *et al.*, 2008). Menurut Samson *et al.* (2010), kapang *Aspergillus niger* memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim misalnya protease, amilase, asam sitrat, pektinase, dan lipase.

Enzim protease adalah salah satu enzim penting yang telah digunakan secara luas dalam aplikasi berbagai bidang industri dan merupakan 65% dari total penjualan enzim di dunia (Chutmanop *et al.*, 2008). Enzim ini dapat dihasilkan oleh mikroorganisme secara ekstraseluler maupun intraseluler (Ikram-Ul-Haq *et al.*, 2006). Kapang *A. niger* yang mampu menghasilkan enzim protease ekstraseluler pada kisaran pH netral sampai basa (7-12) dapat dikelompokkan dalam protease alkali (Srilakshmi *et al.*, 2014).

Protease alkali merupakan salah satu kelompok enzim hidrolitik yang dapat mengkatalisis proses hidrolisis atau pemecahan protein menjadi asam amino penyusunnya dan bekerja pada kisaran pH netral hingga basa (7-12) (Srilakshmi *et al.*, 2014). Kemajuan dalam bidang bioteknologi memungkinkan semakin meluasnya penggunaan enzim protease alkalin dalam berbagai produk komersial. Bentuk produk komersial dalam aplikasi protease alkali pada bidang industri antara lain industri detergen, industri makanan, industri farmasi, susu, kulit, dan pengempukan daging (Charles *et al.*, 2008). Coral *et al.* (2003), dalam penelitiannya mendapatkan bahwa enzim protease dari *A. niger* Z1 dapat aktif pada kisaran pH 8,5 (alkaline), waktu inkubasi 5 hari pada suhu 25°C.

Isolat kapang *A. niger* PAM 18A yang berasal dari tanah Madura dengan habitat pH lingkungan netral sampai basa (7-12) mampu menghasilkan enzim protease. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi produksi enzim yaitu

pH medium, waktu inkubasi, suhu lingkungan, konsentrasi substrat, dan aerasi. Hal tersebut mendorong dilakukannya penelitian untuk mengetahui pengaruh variasi pH dan waktu inkubasi terhadap produksi enzim protease dari *A. niger* PAM18A. Kapang yang digunakan berasal dari tanah Madura, tepatnya Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Bangkalan, Madura.

BAHAN DAN METODE

Bahan. isolat kapang *A. niger* PAM 18A yang berasal dari tanah kawasan Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura, akuades steril, akuades, antibiotik *chloramphenicol*, NaCl 0,85% Tween 80 0,01%, PDA (*Potato DekstroAgar*), *Czapex Dox Agar* (CZ), *Czapek Dox Liquid* (CY), *Czapek Yeast Agar with 20% Sucrose*, dan *Malt Ekstrak Agar* (MEA), kasein, NaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄, FeSO₄.7H₂O, kasein, HCl, BSA (*Bovine Serum Agar*), Na₂CO₃, K-Na-Tartrat, CuSO₄, *Folin-ciocalteau*, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na₂CO₃, NaHCO₃, TCA (*Trichloroacetic Acid*), kasein 2%, laktofenol atau asam laktat 3%, alkohol, dan spirtus.

Rekonfirmasi Kapang *A. niger* PAM 18A (Klich, 2002). Rekonfirmasi dilakukan dengan cara makroskopis dan mikroskopis, yaitu menumbuhkan pada 4 media tumbuh diantaranya *Czapex Dox Agar* (CZ), *Czapek Yeast Agar* (CY25⁰C dan 37⁰C), *Czapek Yeast Agar with 20% Sucrose* (CY20S), dan *Malt Ekstrak Agar* (MEA) selama 7 hari pada suhu kamar. Pengamatan makroskopik meliputi warna koloni, diameter, tekstur, warna sebalik koloni (*reverse of colony*), celah radial koloni (*radial furrow*), dan adanya tetes air (*exudates drops*). Isolat diamati di bawah mikroskop untuk melihat bentuk morfologi hifa, konidia, metula, fialid, konidiofor, dan vesikel. Rekonfirmasi identifikasi kapang dilakukan dengan mencocokkan karakteristik kapang yang diperoleh dari hasil pengamatan dengan buku-buku identifikasi yaitu *Identification of common A.spesies* (Klich, 2002) *Food and Indoor Fungi* (Samson *et al.*, 2010) dan Jamur Benang (Mold) pada Bahan Pangan (Rahayu, dkk, 2014).

Preparasi Inokulum dan Enumerasi Konidia Kapang. Kultur kapang yang berusia

120 jam dalam medium CDA (*Czapex Dox Agar*), ditambahkan 5mL NaCl 0,85% dan *Tween* 80 0,01% kedalamnya. Konidia dilepaskan menggunakan jarum inokulasi. Perhitungan jumlah konidia dilakukan dengan metode TPC (*Total Plate Count*) secara duplo dan OD 0,3 pada panjang gelombang 600 nm. Starter yang digunakan mempunyai kepadatan $2,27 \times 10^8$ konidia/mL pada umur 48 jam.

Produksi Enzim Protease (Zamphorline *et al.*, 2011). Jumlah konidia dalam inokulum telah ditentukan yaitu sebanyak 10^8 konidia/mL. Sejumlah 1% inokulum konidia diinokulasikan ke dalam 50 mL media produksi enzim protease dengan variasi pH 7, 8, 9 secara terpisah. Pemberian pengaruh pH pada media produksi dengan cara ditambahkan dengan NaOH 1 N, kemudian dicek dengan pH meter. Media yang digunakan untuk memproduksi enzim protease adalah media *Czapex Dox* yang mengandung: 2g/l NaNO₃; 1g/l KH₂PO₄; 0,5g/l MgSO₄; 0,01g/l FeSO₄.7H₂O; 30g/l sucrose; 0,5g/l KCL; dan kasein 1 %. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 5, 6 dan 7 hari dengan penggojogkan pada kecepatan 120 rpm. Kultur selanjutnya disaring dengan kertas *Whatman* no. 1, kemudian miselium kapang ditimbang biomasnya. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar, yang selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Ekstrak enzim kasar digunakan dalam uji penentuan aktivitas protease.

Penentuan Aktivitas Enzim Protease (Hagihara, 1958 *in* Yadav, 2011). Aktivitas protease ditentukan berdasarkan kemampuan protease untuk menghidrolisis ikatan peptida pada substrat kasein 1% (w/v) selama 10 menit. Sebanyak 1 mL enzim ditambahkan dengan 1mL kasein 1% (kasein 1% w/v yaitu kasein yang dilarutkan dalam buffer untuk masing-masing pH) kemudian di inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Ditambahkan 3 mL *Trichloroacetic acid* 10% (TCA), kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Masing-masing supernatan yang diperoleh lalu diukur absorbansinya. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum tirosin (275 nm). Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat

membebaskan 1µmol tirosin per menit. Hasil absorbansi yang didapat kemudian diplotkan dengan rumus dari persamaan garis linier kurva standart tirosin, yaitu $y = mx + c$.

$$A_e = \frac{x \cdot 1000}{t \cdot 181,19}$$

Keterangan :

- y = Nilai absorbansi tirosin
- m = Slope kurva pada kurva standart tirosin
- c = Intersep pada kurva standart tirosin
- x = Konsentrasi protein terlarut (µmol tirosin/mL)
- A_e = Aktivitas enzim (U/mL)
- 181,19 = Berat molekul tirosin
- t = Waktu hidrolisis (menit) (Walker, 1994).

Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry (Pierce, 2005). Sebanyak 0,1 mL larutan ekstra kasar enzim (variasi pH 7, 8, dan 9) ditambah 9,8 mL Na₂CO₃ dan 0,1 mL K-Na-Tartrat serta 0,1 mL CuSO₄ dikocok secara perlahan, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran tersebut, lalu ditambahkan dengan 1 mL *Folin-ciocalteau* secara cepat dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum BSA (740 nm) dengan spektrofotometer *UV-Vis*. Kadar protein ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar BSA dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Protein (mg protein/mL)} = X = \frac{y-c}{m}$$

Keterangan :

- y = Absorbansi sampel
- c = Slope pada kurva standart BSA
- m = Intersep pada kurva standart BSA

Uji Penentuan Aktivitas Spesifik Protease. Untuk mendapatkan nilai aktivitas spesifik enzim, digunakan rumus:

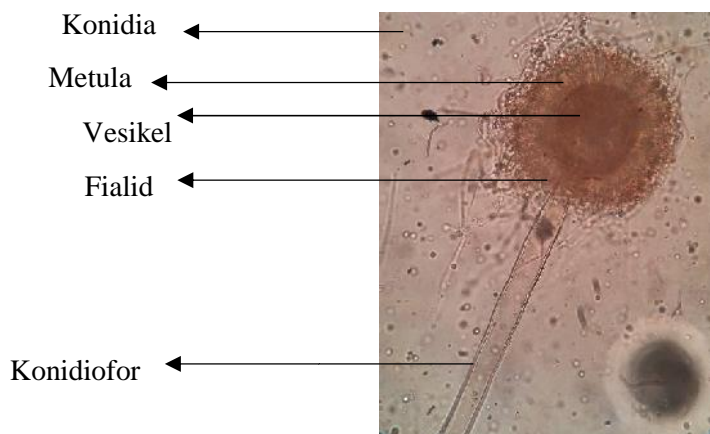
$$\text{Aktivitas Spesifik (Unit/mg protein)} = \frac{\text{Unit Aktivitas (U/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rekonfirmasi Kapang *A. niger* PAM18A. Penelitian ini menggunakan isolat kapang *A. niger* PAM18A yang berasal dari tanah Madura. Menurut (Klich, 2002), pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis dilakukan dengan mengamati

kapang yang ditumbuhkan pada beberapa medium selama 7 hari. Beberapa medium tersebut diantaranya *Czapex Dox Agar (CZ)*, *Czapex Yeast Agar* pada suhu 25°C dan 37°C (CY25 dan CY37), *Czapex Yeast Agar with 20% sucrosa*(CY20S), dan *Malt Ekstrak Agar (MEA)*.

Karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis kapang yang diamati diantaranya warna permukaan koloni, *reverse of colony*, *radial furrow*, diameter koloni, *exudate drop*, dan bentuk *conidial head*.

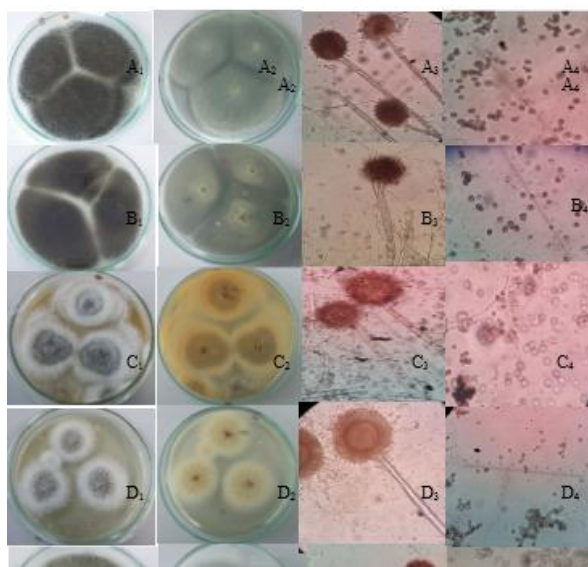


Morfologi mikroskopis *A.niger*PAM18A (100x10) pada medium MEA (*Malt Ekstrak Agar*) umur 7 hari, suhu 25°C.

Tabel 4.1 Ciri Makroskopis dan mikroskopis *A. niger* PAM18A yang ditumbuhkan pada beberapa medium umur 7 hari, suhu 25°C

Pengamatan	Jenis Medium					
	CYA25	CYA37	CY20S	CZ	MEA	
Makroskopis						
Diameter Koloni	78 mm	65 mm	34 mm	80 mm	58 mm	50-70*
Warna koloni	hitam	hitam	hitam	hitam	hitam	hitam*
Reverse of colony	tidak berwarna	tidak berwarna	krem	putih	tidak berwarna	tidak berwarna*
Miselium	tipis	tipis	tebal	tipis	tebal	tebal, putih*
Radial furrow	-	-	-	-	-	-*
Exudate drop	-	+	+	+	+	++
Mikroskopis						
Konidia						
-Bentuk	globose	globose	globose	globose	globose	globose*
-Diameter	2,5-3 µm	3-3,5 µm	3-4 µm	4,5-5 µm	3-5 µm	3-5 µm*
-Permukaan	kasar	kasar	kasar	kasar	kasar	kasar*
Konidiofor						
-Permukaan	halus	halus	halus	halus	halus	halus*
-Panjang	270,5-280 µm	280-295 µm	270-290 µm	260-285 µm	287,5-300 µm	-*
Vesikel						
-Bentuk	globose	globose	globose	globose	globose	globose*
-Diameter	56-60 µm	54-60 µm	40-48 µm	50-55 µm	62-70 µm	12-20 µm*
Conidial head						
-Susunan	biseriate	biseriate	biseriate	biseriate	biseriate	biseriate*
Metula						
-Warna/Panjang	coklat, 9-12µm	coklat, 9-14µm	coklat, 7µm	coklat, 7-10µm	coklat, 10-13 µm	coklat, 12-20 µm*
Fialid						
-Warna/Panjang	coklat 5 µm	coklat 6 µm	coklat 5-7 µm	coklat 6µm	coklat 4-6 µm	coklat 7-10 µm*

Keterangan: * ciri makroskopis dan mikroskopis *A. niger* pada medium MEA menurut Kilich, (2002); CYA25 & CYA37 (*Czapex Dox Agar* pada suhu 25°C dan 37°C); CY20S (*Czapex Yeast with 20% Sucrosa*); CZ (*Czapex Dox Agar*); dan MEA (*Malt Ekstrak Agar*).



Morfologi makroskopis dan mikroskopis dari *A.niger* PAM18A (40x10) pada berbagai medium umur 7 hari, suhu 25°C.

Keterangan :

- A₁, A₂, A₃, A₄ : permukaan koloni, *reverse colony*, konidiofor dan spora pada medium CYA37⁰C
B₁, B₂, B₃, B₄ : permukaan koloni, *reverse colony*, konidiofor dan spora pada medium CYA25⁰C
C₁, C₂, C₃, C₄: permukaan koloni, *reverse colony*, konidiofor dan spora pada medium MEA
D₁, D₂, D₃, D₄ : permukaan koloni, *reverse colony*, konidiofor dan spora pada medium CY20S
E₁, E₂, E₃, E₄: permukaan koloni, *reverse colony*, konidiofor dan spora pada medium CZ

Hasil pengamatan karakterisasi pada Tabel 4.1, Gambar 4.1 dan Gambar 4.2 menunjukkan bahwa isolat kapang yang digunakan termasuk dalam genus *Aspergillus*, karena memiliki karakteristik yakni morfologi koloni yang berwarna hitam, vesikel berbentuk *globose*, *biseriate*, *conidial head* berbentuk *globose* dan berwarna coklat. Webster & Weber, (2007) menyatakan bahwa Genus *Aspergillus* termasuk dalam filum *Ascomycota*, kelas *Eurotiomycetes*, ordo *Eurotiales*, famili *Trichocomaceae*. Menurut Samson *et al.* (2010), genus *Aspergillus* dibagi menjadi beberapa subgenus, yaitu *Fumigati*, *Circumdati*, dan *Ornati*. Tiap subgenus terdiri dari beberapa *section*, misalnya subgenus *Circumdati* terbagi menjadi *section flavi* dan *niger*.

Isolat kapang yang digunakan diidentifikasi sebagai *A. niger* PAM 18A, dengan ciri-ciri isolat sebagai berikut koloni yang berwarna hitam, konidia yang berbentuk *globose* dengan diameter berkisar 3,5-4,5 μ m dan *conidial head* yang berbentuk *radiate* (Klich, 2012). *A. niger* bersifat *ubikuitus* dan dapat ditemukan pada buah anggur, kopi, jagung, bawang, udara dalam ruang tertutup dan tanah. Secara fisiologi *A. niger* bersifat halo-toleran, dapat bertahan dan tumbuh dengan baik pada suhu dan pH yang tinggi serta konidia yang berwarna hitam cenderung resisten terhadap radiasi matahari (Samson *et al.*, 2010). Beberapa spesies dari genus *Aspergillus* telah dilaporkan mampu menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler misalnya amilase, selulase dan protease. Enzim ini mempunyai peran penting dalam bidang industri (Pandey *et al.*, 1999 in Suganthi *et al.*, 2012). Anggota subgenus *Circumdati* misalnya *A. niger*, dan *A. awamori*

telah diketahui memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim protease dan banyak digunakan dalam bidang industri makanan (Berka *et al.*, 1992).

Penentuan Aktivitas Enzim Protease.

Produksi enzim protease dari *A. niger* PAM 18A dapat diketahui melalui aktivitasnya dalam menghidrolisis substrat kasein menjadi asam-asam amino penyusunnya. Penentuan aktivitas enzim lebih tepat dilakukan dengan cara mengukur produk yang dihasilkan, daripada mengukur berkurangnya substrat. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat membebaskan 1 μ mol tirosin per menit, hal ini didasarkan pada proses hidrolisis substrat kasein menjadi asam amino penyusunnya. Nilai rata-rata aktivitas enzim protease dari *A. niger* PAM 18A pada perlakuan kombinasi pH dan waktu inkubasi yang berbeda, dapat dilihat pada Gambar 4.3.

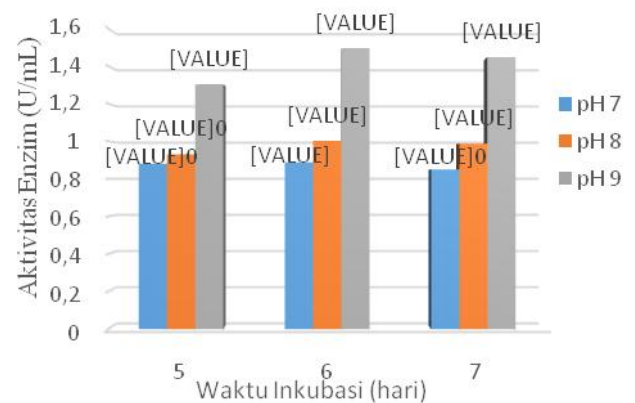


Diagram batang rata-rata aktivitas enzim *A. niger* PAM 18A dengan berbagai macam kombinasi perlakuan pH dan waktu inkubasi

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa perlakuan pH medium dan waktu inkubasi, berpengaruh terhadap aktivitas protease ekstraseluler, sedangkan kombinasi antara pH dan waktu inkubasi tidak berpengaruh terhadap aktivitas protease ekstraseluler yang dihasilkan *A. niger*

PAM18A ($p < 0,05$) (Lampiran 6.1.3). Aktivitas enzim protease tertinggi yang dihasilkan *A. niger* PAM18A pada penelitian ini ditunjukkan pada perlakuan P₉T₆ sebesar 1,495 U/mL, yang nilainya berbeda tidak nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya (Gambar 4.3). Berdasarkan pH optimumnya protease diklasifikasikan sebagai protease asam, netral, dan alkalin. Enzim protease yang aktif pada rentang pH 8,0-12,0 dapat diklasifikasikan sebagai protease alkalin (North, 1989 dalam Yusriah, 2013). Devi *et al.*, (2012), dalam penelitiannya mendapatkan bahwa *A. niger* mampu menghasilkan aktivitas enzim protease tertinggi pada hari ke-7 dengan rentang pH antara netral hingga basa (7-9). Hasil penelitian Coral *et al.* (2013), mendapatkan bahwa protease alkalin yang diproduksi oleh *A. niger* Z1 menghasilkan nilai aktivitas enzim sebesar 11,95 U/mg pada pH 8,5, waktu inkubasi 5 hari dan suhu 25°C. Hal ini terjadi karena isolat *A. niger* Z1 memiliki sifat *alkalophilic*, sehingga memiliki pertumbuhan yang optimum pada pH 7-12.

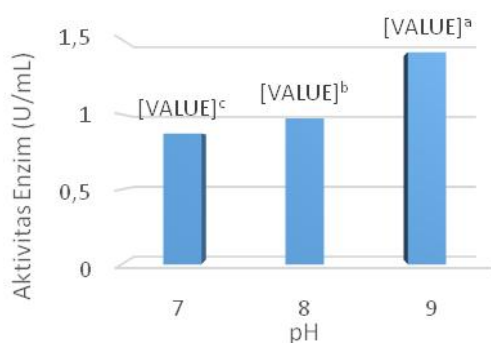


Diagram batang pengaruh variasi pH terhadap aktivitas enzim protease (U/mL) dari *A. niger* PAM18A.

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata berdasarkan uji BNT dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil uji lanjut BNT (5%) (Lampiran 6.1.4) untuk pengaruh setiap perlakuan pH

medium menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM18A ($p < 0,05$) (Gambar 4.4). Gambar 4.4 menunjukkan bahwa kenaikan nilai aktivitas enzim protease berbanding lurus dengan kenaikan pH. Nilai aktivitas enzim terendah pada pH 7 dan tertinggi pada pH 9. pH medium pertumbuhan yang berbeda-beda akan mempengaruhi permeabilitas sel kapang dalam mensekresikan enzim. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor pH yang memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim protease dengan nilai tertinggi pada pH 9. Menurut Abidi *et al.* (2014), *A. niger* yang diisolasi dari buah jeruk dapat aktif bekerja pada kisaran pH 7-10. Enzim merupakan polimer dari asam amino yang memiliki muatan positif, netral, maupun negatif. Hal ini menyebabkan kinerja enzim dipengaruhi oleh keberadaan ion H⁺ (asam) atau OH⁻ (basa). Ion H⁺ yang berada pada gugus karboksil (COOH) sisi aktif enzim akan menarik ion OH⁻ saat medium pada kondisi basa. Gugus ionik berperan penting dalam menjaga konformasi sisi aktif enzim untuk mengikat dan mengubah substrat menjadi produk (Ngili, Y. 2010).

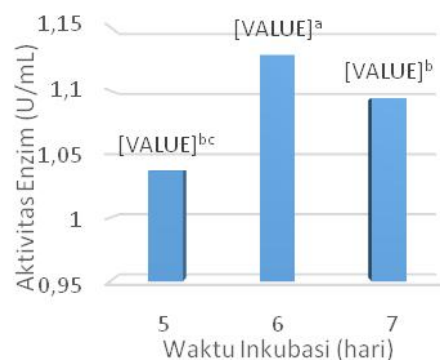


Diagram batang pengaruh variasi waktu inkubasi (hari) terhadap aktivitas enzim protease (U/mL) dari *A. niger* PAM18A.

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata berdasarkan uji BNT dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil uji lanjut BNT (5%) (Lampiran 6.1.4) pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM18A menunjukkan perlakuan waktu inkubasi 6 hari berbeda nyata dengan perlakuan waktu inkubasi 5 hari dan 7 hari ($p < 0,05$) (Gambar 4.4). Hal ini menandakan bahwa perlakuan waktu inkubasi pada penelitian ini berpengaruh terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM18A.

Peningkatan biomassa miselium (Tabel L.3.3.1) dan aktivitas enzim protease (Gambar 4.4) yang dihasilkan oleh kapang *A. niger* PAM 18A ditunjukkan pada waktu inkubasi hari ke-6. Hal tersebut kemungkinan karena kapang *A. niger* PAM18A berada pada fase pertumbuhan logaritmik atau fase eksponensial. Selama fase ini terjadi degradasi medium kasein yang digunakan untuk pertumbuhan.

Menurut Brock & Madigan (2012), enzim digolongkan sebagai metabolit primer yang biasanya akan dibentuk pada fase pertumbuhan logaritmik. Fase ini pertumbuhan sel akan terjadi dengan cepat dan produksi enzim akan meningkat. Waktu inkubasi memiliki peran penting dalam aplikasi enzim pada bidang industri untuk menghasilkan produk yang bernilai komersil. Terlihat penurunan aktivitas enzim pada waktu inkubasi hari ke-7 untuk seluruh perlakuan variasi pH (Gambar 4.5), namun penurunannya tidak terlalu besar. Penurunan aktivitas enzim akan terjadi apabila kapang tersebut berhenti tumbuh atau protein yang terdapat pada substrat sudah habis diuraikan menjadi asam amino yang lebih sederhana

Penentuan Kadar Protein. Penentuan kadar protein dalam penelitian ini dilakukan analisa secara kuantitatif dengan metode *Lowry* berdasarkan kurva standart BSA (*Bovine Serum Albumin*). Kadar protein harus diketahui agar dapat menentukan aktivitas spesifik enzim terkait per milligram protein (Clark, 1997; Pierce, 2005). Gambar 4.6 menunjukkan nilai rata-rata kadar protein *A. niger* PAM18A pada berbagai perlakuan kombinasi pH dan waktu inkubasi yang berbeda.



Diagram batang rata-rata kadar protein dari *A. niger* PAM18A dengan berbagai macam kombinasi perlakuan pH medium dan waktu inkubasi.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (*ANOVA*) (Gambar 4.6) menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi pH dan waktu inkubasi tidak berpengaruh terhadap kadar protein yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM 18A, dan berbeda tidak nyata untuk setiap kombinasi perlakuannya ($p < 0,05$) (Lampiran 6.2.3). Perlakuan variasi pH medium berpengaruh terhadap kadar protein, sedangkan perlakuan waktu inkubasi tidak memberi pengaruh terhadap kadar protein yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM18A ($p < 0,05$) (Lampiran 6.2.3).

Kadar protein *A. niger* PAM 18A tertinggi terjadi pada perlakuan P₉T₆ yaitu sebesar 0,460 mg/mL, dan berbeda tidak nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya (Gambar 4.6). Peningkatan kadar protein terlihat pada hari ke-5 hingga ke-6, hal tersebut terjadi karena kapang *A. niger* PAM 18A berada pada fase pertumbuhan logaritmik (Gambar 4.6). Saat *A. niger* PAM18A berada pada fase ini, daya katalitik enzim menjadi tinggi dan asam-asam amino (produk) yang dihasilkan juga akan meningkat, dimana enzim sendiri tersusun atas asam-asam amino. Menurut Pierce (2005), kandungan protein di dalam enzim sangat berpengaruh terhadap daya katalitik enzim tersebut. Adanya peningkatan kadar protein dalam suatu enzim, maka daya katalitiknya juga akan meningkat. Keberadaan protein lain juga dapat menyebabkan nilai kadar protein menjadi naik. Protein lain yang terlarut juga dapat terbaca pada pengukuran yang menyebabkan nilai kadar protein menjadi naik (Murray *et al.*, 2003).

Terlihat pada Gambar 4.6 terjadi penurunan kadar protein yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM18A pada waktu inkubasi hari ke-7

untuk semua perlakuan pH medium. Hal tersebut mungkin terjadi karena kapang *A. niger* PAM 18A mulai berada pada fase kematian. Menurut Kresnamurti (2001), semakin rendah aktivitas enzim protease maka semakin rendah pula kadar protein yang dihasilkan, karena terjadi akumulasi sulfur sebagai hasil samping metabolisme suatu sel. Saat kapang *A. niger* PAM18A berada pada fase kematian terjadi akumulasi dari sulfur (hasil samping metabolisme) dapat menyebabkan terhambatnya sintesis protein terutama enzim, sehingga pada kondisi tersebut kadar protein dan aktivitas enzim akan menurun.

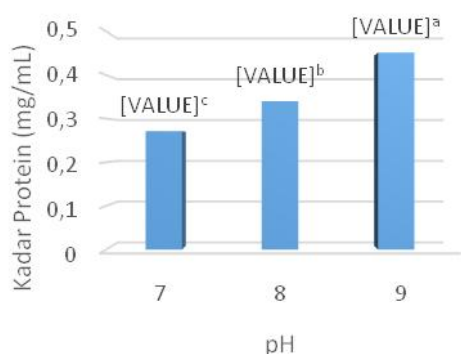


Diagram batang pengaruh variasi pH terhadap kadar protein (mg/mL) dari *A. niger* PAM18A

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata berdasarkan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil uji lanjut Duncan (5%) (Lampiran 6.2.4) untuk pengaruh setiap perlakuan pH medium menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kadar protein *A. niger* PAM18A (Gambar 4.7).

Penentuan Aktivitas Spesifik Protease.

Penentuan aktivitas spesifik enzim protease dapat diperoleh dengan cara membagi hasil aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Satuan dari aktivitas spesifik enzim yaitu jumlah unit enzim per mg protein pada kondisi optimum. Aktivitas spesifik enzim merupakan suatu ukuran kemurnian yang ukuran nilainya akan meningkat selama proses pemurnian (Wijaya, 2002). Gambar 4.7 menunjukkan nilai rata-rata aktivitas spesifik dari enzim protease yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM18A dengan perlakuan kombinasi pH dan waktu inkubasi.



Diagram batang rata-rata aktivitas spesifik protease *A. niger* PAM 18A dengan berbagai macam kombinasi perlakuan pH medium dan waktu inkubasi.

Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) (Gambar 4.7) menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi variasi pH dan waktu inkubasi tidak berpengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim protease *A. niger* PAM 18A karena $F_{hitung} < F_{tabel}$ ($p < 0,05$). Perlakuan variasi pH medium dan waktu inkubasi juga tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas spesifik enzim protease yang dihasilkan oleh *A. niger* PAM18A ($p < 0,05$). Dapat dilihat pada Gambar 4.7, nilai aktivitas spesifik enzim protease tertinggi ditunjukkan pada perlakuan P₈T₅ yaitu sebesar 3,632U/mg protein, namun berbeda tidak nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya. Hal ini menandakan bahwa pada kondisi lingkungan tersebut kapang *A. niger* PAM 18A dapat memproduksi enzim protease dalam jumlah tinggi. Suganthi *et al.* (2012), dalam penelitian mendapatkan bahwa *A. niger* yang berasal dari GRD Women's hostel menunjukkan aktivitas spesifik enzim protease tertinggi sebesar 33,45U/mg pada pH 7,5, waktu inkubasi 7 hari dan suhu 40°C.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa isolat kapang yang digunakan diidentifikasi sebagai *A. niger* PAM18A. Isolat kapang *A. niger* PAM18A yang berasal dari tanah Desa sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura mampu menghasilkan aktivitas enzim protease tertinggi pada kondisi pH medium 8 dan

waktu inkubasi 5 hari sebesar 0,930 U/mL dan kadar protein sebesar 0,268 mg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidi F., Aissaoui N., Lazar S., & Marzouki M. N., 2014, Purification and Biochemical Characterisation of A Novel Alkaline Protease from *Aspergillus niger*. Use in Antioxidant Peptides Production. *Environ, Sci.* 5(5):1490-1499.
- Berka, R.M., Coleman, N.D., and Ward, M. 1992. Industrial Enzymes from *Aspergillus* Species. In Bennet, J. W & Klich, M. A. (Eds) 1992. *Aspergillus: Biology and Industrial Application*. Butterworth-Heinemann. USA.
- Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M. N., Kalaichelvan, P. T. & Byung-Kl. Purification, Characterisation and Crystallisation of An Extracellular Alkaline Protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of Basic Microbiology*. 48: 347-352.
- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., & Srinophakun P., 2008, Protease Production by *Aspergillus oryzae* in solid-state Fermentation using Agroindustrial Substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83:1012-1018.
- Clark, Jr., John, M. & Switzen, R. L. 1997. *Experimental Biochemistry*. 2nd edition, John Wiley and Sons Inc., USA. 116-123.
- Coral, G., Arikan, B. Unaldi, M.N. & Guvenmez, H. 2003. Thermostable alkaline protease produced by *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*. 53(4):491-498.
- Ikram-ul-haq, M. M. J, T.S. Khan & Zafa S. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Res. J. Agric & Biol. Sci.* 1(3):241-245.
- Klich, M.A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht. Netherlands.
- Kresnamurti. 2001. Substitusi Bekatul pada Medium Onggok sebagai Sumber Nitrogen untuk Produksi Enzim oleh *Aspergillus niger*. *Skripsi*. Jurusan Biologi. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Murray, R.K., Granner, D.K, Mayes, P.A., & Rodwell, V.W. 2003. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Ed 25. Jakarta. 270.
- Pandey, & Singhania, R. R., 2008, Production and Application of Industrial Enzymes. *Chem Digest*. 21: 82-91.
- Pandey, & Singhania, R. R., 2008, Production and Application of Industrial Enzymes. *Chem Digest*. 21: 82-91.
- Pierce. 2005. *Protein Assay: Technical Handbook*, Pierce Biotechnology. Inc. USA.
- Rahayu, E.S., Sardjono, & Samson, R.A. 2014. Jamur Benang (*Mold*) pada Bahan Pangan. Kanisius. Yogyakarta. 131-136.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Adersen, B. 2010. *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, Netherland. 130-131.
- Suganthi, R., anjana, H., Arumugan, M., Arungopal, M., Kumar, R., & Benazir, F. J. 2012. *Aspergillus niger*. A Potential Enzyme Producer on Cost Effective Agro Industrial wastes. *Research Journal of Biotechnology*. 7 (1): 166-168.
- Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., & Ammani, K. 2014. Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present, and Future Prospects. *J. Pharm, C. Bio. Sci.* 2(4):218-234.

- Webster, J. & Weber, R. W. S. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge University Press. UK.
- Wijaya, S. 2002. Isolasi kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. Jurnal Ilmu Dasar. 3: 30-35.
- Yadav S. K., Bishit D., Shikha., & Darmwal N. S., 2011, Oxidant and Solvent stable Alkaline Protease from *Aspergillus flavus* and its Characteritation. *Biotech*, 10(43): 8630-8640.
- Zamphorline, L.M., Cabral, H., Arantes, A., Assis, A., Juliano, L., Juliano, M.A., Da-Silva, R., Gomes, E., & Bonilla R. 2011. Purification of New Alkaline Serine Protease from The Thermofilic Fungus *Myceliophthora* sp. *Sciverse Science Direct. Prosess Biochemistry*. 28: 2137-2143.