

OPTIMASI JENIS DAN KADAR SUMBER NITROGEN SERTA pH MEDIUM UNTUK PRODUKSI PROTEASE DARI ISOLAT HTcUM_{6.2.2} DARI TAUCO SURABAYA

Monika Rahayu dan *Evi Susanti

Jurusan Kimia FMIPA
Universitas Negeri Malang

*email: evi.susanti.fmipa@um.ac.id

Received 26 Oktober 2017

Accepted 28 Nopember 2017

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sumber nitrogen, kadar sumber nitrogen dan pH optimum untuk produksi protease isolat HTcUM_{6.2.2}. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktorial masing-masing yaitu jenis, kadar sumber nitrogen, serta pH medium dengan tahap penelitian terdiri dari peremajaan, validasi kemurnian isolat HTcUM_{6.2.2}, produksi ekstrak kasar protease isolat HTcUM_{6.2.2}, uji aktivitas protease. Hasil penelitian menunjukkan sumber nitrogen optimum untuk menghasilkan protease dari isolat HTcUM_{6.2.2} adalah susu skim dan limbah cair tahu. Kadar limbah cair tahu optimum untuk produksi protease dari isolat HTcUM_{6.2.2} sebesar 10 %. Produksi protease cukup tinggi dan relatif konstan antara pH 6 sampai 8. Aktivitas protease tertinggi sebesar 0,817 U/ml dicapai dengan penggunaan 10 % (v/v) limbah cair tahu pada medium produksi, pH = 7 selama 3 hari.

Katakunci: protease, tauco, isolat, nitrogen, limbah cair tahu

Abstract

This study aims to determine the optimum of the nitrogen source, percentage of nitrogen source and pH for the production of protease from isolate HTcUM_{6.2.2}. This research is a laboratory experimental with a research stage comprising inoculation and validation of the purity of the isolates HTcUM_{6.2.2}, production of crude extract of protease to determine source of nitrogen, percentage of nitrogen source and pH optimum, determination of protease activity. The results showed that the optimum source of nitrogen to produce proteases from the HTcUM_{6.2.2} isolate was skim milk and tofu wastewater. Percentage of nitrogen source optimum to produce protease of HTcUM_{6.2.2} isolate was 10 % of tofu wastewater. Protease production is relatively high and constant at pH 6 to 8. The highest protease activity was achieved by the use of 10 % (v/v) tofu wastewater at production medium, pH = 7 for 3 days was 0,817 U/mL.

The keywords: protease, tauco, isolate, nitrogen, tofu wastewater

Pendahuluan

Protease merupakan salah satu enzim yang banyak diproduksi secara komersial pada berbagai industri, antara lain industri makanan, farmasi, deterjen, dan diagnostik. *Porcine pepsin* atau pepsin dari

lambung babi adalah protease yang digunakan untuk proses produksi kolagen (Yang & Shu, 2014), khususnya di negara-negara produsen kolagen seperti Amerika Utara, Eropa, dan Asia Pasifik. Padahal Indonesia mengimpor kolagen sekitar

2.715.782 kg per tahun dari negara-negara tersebut (BPS, 2016). Hal ini menyebabkan timbulnya keraguan akan kehalalan kolagen tersebut. Mengatasi hal ini Ramadhan (2016) telah mengisolasi dan menyeleksi isolat bakteri potensial sebagai sumber protease dari pangan fermentasi tauco yang diharapkan dapat digunakan untuk isolasi kolagen dari sisik ikan bandeng sebagai pengganti *porcine pepsin* yaitu HTcUM₂, HTcUM_{6.2.1}, HTcUM_{6.2.2}, dan HTcUM₁₀.

Satu dari keempat isolat tersebut (HTcUM₁₀) menunjukkan aktivitas protease yang rendah yaitu sebesar 0,11 U/mL dalam medium produksi yang mengandung sumber nitrogen pepton. Padahal isolat tersebut memiliki indeks proteolitik yang cukup tinggi dalam media Susu Skim Agar (SSA). Sumber nitrogen pepton yang digunakan dalam medium produksi tersebut diduga tidak dapat menginduksi produksi protease isolat tersebut. Beberapa penelitian melaporkan bahwa bakteri spesies yang sama menghasilkan aktivitas protease yang berbeda-beda dalam sumber nitrogen yang berbeda. Chu (2007) melaporkan bahwa *Basillus subtilis* menghasilkan protease optimum pada medium produksi yang mengandung sumber nitrogen berupa pepton (836,3 U/mL), sedangkan Ahmed *et al.* (2010) melaporkan bahwa *Basillus subtilis* menghasilkan protease lebih tinggi pada medium produksi yang mengandung sumber nitrogen berupa susu skim (154.05±1.21 U/mL) dibandingkan dengan kasein (149.85±1.11 U/mL).

Senyawa yang digunakan sebagai sumber nitrogen dapat berupa garam-garam anorganik seperti kalium nitrat, amonium sulfat, dan amonium nitrat maupun senyawa-senyawa organik dari bahan yang mengandung protein seperti pepton, ekstrak khamir, tripton, dan urea. (Pelczar & Chan, 2010: 132-137). Masing-masing sumber nitrogen organik memiliki kadar dan kandungan protein yang khas. Kacang-kacangan pada proses perkecambahan memiliki kadar protein

sekitar 20-25 % berat kering. Tiyono (2011) juga menyatakan bahwa dalam biji kacang hijau mengandung protein sebesar 22,8%, sedangkan biji kedelai sebesar 40% (Suhaidi, 2003). Limbah cair tahu mengandung protein sebesar 45% (Ounis *et al.*, 2008). Kandungan protein utama dalam susu skim adalah kasein mencapai 3,7% (Buckle *et al.* 1987). Pepton merupakan hasil hidrolisis dari suatu bahan yang mengandung protein melalui proses enzimatik. Bahan tersebut dapat berasal dari daging, ikan, kasein, gelatin, keratin, tepung kedelai, khamir dan lain-lain (Nurhayati *et al.*, 2015).

Produksi protease tidak hanya dipengaruhi oleh sumber nutrisi yang terkandung pada media produksi, tetapi juga dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan seperti pH medium. Masing-masing bakteri memiliki pH optimum yang berbeda-beda tergantung jenis bakterinya. Jika bakteri ditumbuhkan diluar pH optimumnya, maka akan menurunkan pertumbuhan bakteri. Penurunan pertumbuhan bakteri menyebabkan produksi metabolit termasuk protease menurun. Isolat HTcUM_{6.2.2} memiliki indeks proteolitik yang tinggi, diduga dapat menghasilkan aktivitas yang tinggi pada media produksi dengan sumber nitrogen dan kondisi pertumbuhan yang optimum

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan alat-alat berupa peralatan gelas dan peralatan khusus yaitu *magnetic stirrer*, kawat ose ujung lingkaran, autoklaf, oven, Eyela *soft incubator* SLI-600ND, *waterbath inkubator* Memmert, Eyela *Uni Termo Shaker* NTS 1300, neraca analitik ACIS, vortex, enkas, *centrifuge* kokusan, *Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Centrifuge*, *Thermo Scientific Hot Plate Stirrer*, dan *Bio Rad Smartspec Plus Spectrofotometer*. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini berderajat p.a. (pro analisis) yaitu: Natrium Klorida (NaCl), Natrium

Hidroksida (NaOH), Natrium Karbonat (Na_2CO_3), Folin Ciocalteu, *Buffer* fosfat pH 7 50 mM, BSA (*Bovine Serum Albumin*), glukosa, pepton oksid, magnesium sulfat heksahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), besi (II) sulfat heksahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tembaga (II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), natrium sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), tirosin, TCA (Asam trikloroasetat), kasein, dan baktoagar. Bahan-bahan berderajat teknis antara lain susu skim, bubuk kedelai, rebusan kecambah, limbah cair tahu, akuades, alkohol dan spiritus.

Peremajaan isolat HTcUM_{6.2.2}

Peremajaan isolat HTcUM_{6.2.2} dilakukan dengan mengambil satu koloni tunggal dari isolat induk HTcUM_{6.2.2} dan distreak empat kuadran pada media Susu Skim Agar (SSA).

Optimasi jenis sumber nitrogen untuk produksi ekstrak kasar protease

Metode isolasi protease dengan optimasi jenis sumber nitrogen menggunakan jenis sumber nitrogen berupa pepton oksid, susu skim, kasein, bubuk kedelai, rebusan kecambah, dan limbah cair tahu. Isolasi protease dan pengukuran aktivitas mengacu pada penelitian Alnahdi (2012) dengan modifikasi. Sebanyak 1 ose koloni tunggal bakteri dari isolat HTcUM_{6.2.2} yang telah murni diinokulasikan ke dalam 100 mL medium produksi yang mengandung (g/mL) 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,5 KH_2PO_4 ; 0,5 glukosa; untuk sumber nitrogen pepton, susu skim, kasein, dan bubuk kedelai 0,75; sedangkan untuk sumber nitrogen air rebusan kecambah dan limbah cair tahu 10% v/v pada pH 7. Inokulum diinkubasi pada suhu 37 °C dengan agitasi 100 rpm selama 72 jam. Setelah itu inokulum diambil ±10 mL dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar

enzim protease yang diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Optimasi kadar sumber nitrogen untuk produksi ekstrak kasar protease

Metode isolasi protease pada optimasi kadar sumber nitrogen dengan variasi kadar limbah cair tahu (v/v) 1%, 5%, 10%, dan 15%. Isolasi protease dan pengukuran aktivitas mengacu pada penelitian Alnahdi (2012) dengan modifikasi. Sebanyak 1 ose koloni tunggal bakteri dari isolat HTcUM_{6.2.2} yang telah murni diinokulasikan ke dalam 100 mL medium produksi yang mengandung (g/mL) 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 KH_2PO_4 ; 0,5 glukosa; dan sumber nitrogen menggunakan limbah cair tahu dengan variasi kadar (v/v) 1%, 5%, 10%, dan 15% pada pH 7. Inokulum diinkubasi pada suhu 37 °C dengan agitasi 100 rpm selama 72 jam. Setelah itu inokulum diambil ±10 mL dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim protease yang diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Optimasi pH medium untuk produksi ekstrak kasar protease

Metode isolasi protease dengan optimasi pH medium pada pH 4, 5, 6, dan 7. Isolasi protease dan pengukuran aktivitas mengacu pada penelitian Alnahdi (2012) dengan modifikasi. Sebanyak 1 ose koloni tunggal bakteri dari isolat HTcUM_{6.2.2} yang telah murni diinokulasikan ke dalam 100 mL medium produksi yang mengandung (g/mL) 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,5 KH_2PO_4 ; 0,5 glukosa; dan sumber nitrogen menggunakan limbah cair tahu 10% v/v dengan variasi pH 4, 5, 6, dan 7 dan 8. Inokulum diinkubasi pada suhu 37 °C dengan agitasi 100 rpm selama 72 jam. Setelah itu inokulum diambil ±10 mL dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim protease yang diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Pembuatan kurva standar tirosin dengan metode anson

Sebanyak 2 mL larutan standar yang mengandung 0 (blanko), 10, 30, 50, dan 70 µg/mL tirosin ditambahkan 5 mL larutan 0,5 M Na₂CO₃ dan 1 mL reagen Folin Ciocalteu. Larutan dihomogenkan dengan vortex kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit. Kompleks berwarna biru yang terbentuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm. Data konsentrasi tirosin dan absorbansinya digunakan untuk membuat kurva standar tirosin.

Uji aktivitas protease

Uji aktivitas protease merujuk pada penelitian Alnahdi (2012). Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan cara 0,5 mL substrat kasein (1% b/v) dalam 50 mM buffer fosfat pH 7 dimasukkan dalam tabung reaksi dan dicampur dengan 0,2 mL ekstrak kasar enzim, diinkubasi pada penangas air pada suhu 40 °C selama 20 menit, ditambahkan 1 mL TCA (10% b/v), campuran dihomogenkan dengan vortex dan dijaga pada suhu ruang selama 15 menit. Campuran disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dicampur dengan 2,5 ml Na₂CO₃ 0,4 M dan ditambahkan 1 mL reagen Folin Cioceltau. Larutan dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap selama 30 menit. Setelah itu, larutan hasil diukur absorbansi pada 660 nm dengan blanko menggunakan larutan tirosin standar. Kontrol mengikuti cara yang sama tetapi penambahan larutan TCA (10% b/v) sebelum penambahan substrat kasein (1% b/v) dalam 50 mM *buffer* fosfat pH 7.

Aktivitas enzim dinyatakan dalam Unit (U), satu unit aktivitas enzim sama dengan banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 mikrogram tirosin setiap mililiter larutan per menit pada kondisi percobaan. Penentuan kadar tirosin ditentukan dengan cara hasil absorbansi sampel pada panjang gelombang 660 nm

diinterpolasikan pada persamaan regresi kurva standar tirosin. Konsentrasi tirosin yang telah diketahui kemudian dimasukkan dalam persamaan untuk menghitung aktivitas enzim. Berikut ini adalah persamaan yang digunakan:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{C \times V_{es}}{t \times V_e} \quad (1)$$

dengan, *C* (konsentrasi tirosin (µg/mL)), *V_{es}* (volume total pengujian enzim-substrat (mL) = 0,7 mL), *t* (waktu inkubasi enzim-substrat (menit)) dan *V_e* (volume enzim (mL) = 0,2 mL)

Pembuatan kurva standar protein dan pengukuran kadar protein dengan metode Lowry

Sebanyak 0,5 larutan protein standar yang mengandung 0 (blanko), 20, 40, 60, 80, 100 µg BSA (*Bovine Serum Albumin*), ditambah 2,5 mL pereaksi biuret, diaduk hingga homogen. Campuran diinkubasi pada suhu kamar tepat 10 menit. Setelah itu campuran ditambahkan 0,25 mL Folin Ciocalteu, dihomogenkan dengan vortex, dan diinkubasi pada suhu kamar tepat 30 menit. Nilai absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 750 nm. Data konsentrasi BSA dan absorbansinya digunakan untuk membuat kurva standar protein.

Penentuan aktivitas spesifik protease

Aktivitas spesifik dapat diukur dengan membandingkan nilai aktivitas enzim per miligram protein ekstrak kasar selulernya. Jumlah protein dapat dihitung jika diketahui kadar atau konsentrasi protein dalam larutan enzim. Untuk penentuan kadar protein, hasil absorbansi sampel pada panjang gelombang 750 nm diinterpolasikan pada persamaan regresi kurva standar protein. Kadar atau konsentrasi protein yang telah diketahui kemudian dimasukkan dalam persamaan untuk menghitung aktivitas spesifik enzim.

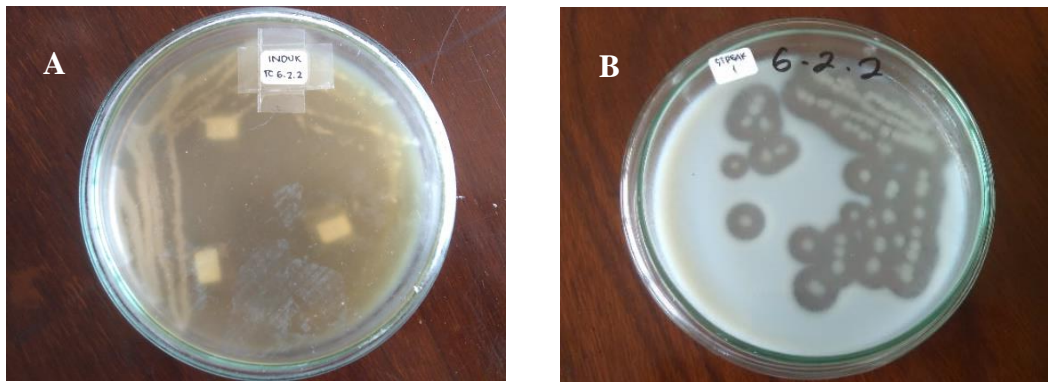
Hasil dan Pembahasan

Peremajaan isolat HTcUM 6.2.2

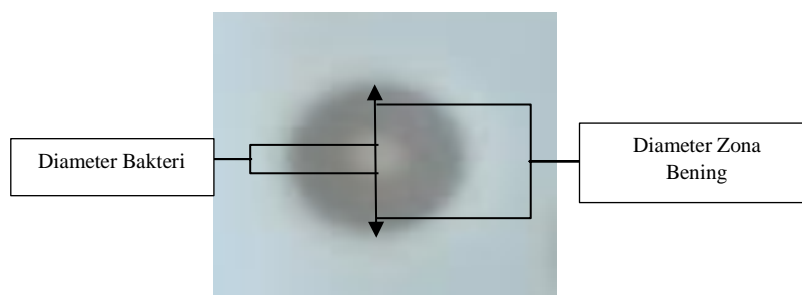
Peremajaan isolat HTcUM_{6.2.2} dilakukan dengan mengambil satu koloni dari isolat induk HTcUM_{6.2.2} dan distreak empat kuadran pada media SSA (Susu Skim Agar). Pertumbuhan bakteri protease pada media SSA dapat diamati dari terbentuknya zona bening disekitar koloni. Hal ini disebabkan bakteri tersebut menghidrolisis kasein susu yang awalnya berwarna putih keruh menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino yang ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni (Pakpahan, 2009). Hasil

dari peremajaan isolat HTcUM_{6.2.2} dapat dilihat pada Gambar 1

Hasil peremajaan isolat HTcUM_{6.2.2} menghasilkan zona bening dengan diameter 1,12 cm dan diameter bakterinya sebesar 0,43 cm dengan waktu inkubasi pertumbuhan selama tiga hari. Berdasarkan perolehan data tersebut, isolat HTcUM_{6.2.2} mampu menghasilkan indeks proteolitik sebesar 2,60. Indeks proteolitik merupakan perbandingan diameter zona bening dengan diameter bakteri. Pengukuran indeks proteolitik diilustrasikan pada Gambar 2.



Gambar 1. Isolat induk HTcUM_{6.2.2} (A) dan hasil peremajaan isolat HTcUM_{6.2.2} (B)



Gambar 2. Pengukuran Diameter Zona Bening dan Bakteri Hasil Hidrolisis Kasein Susu oleh Bakteri

Optimasi Jenis Sumber Nitrogen untuk Produksi Protease dari Isolat HTcUM_{6.2.2}

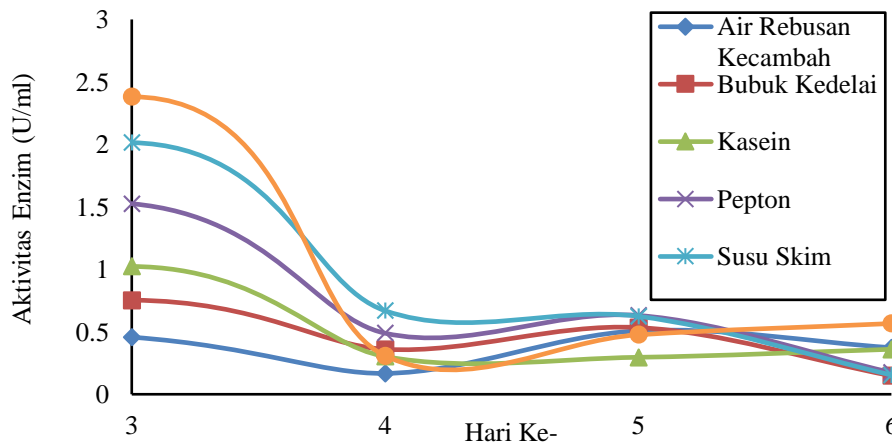
Bakteri memerlukan sumber nutrisi untuk proses metabolismenya. Sumber nutrisi tersebut berasal dari senyawa nitrogen, karbon, dan senyawa lain. Pada penelitian ini digunakan sumber nitrogen berupa senyawa-senyawa organik murni

seperti kasein dan pepton juga sumber nitrogen yang berasal dari bahan alamiah seperti susu skim, bubuk kedelai, air rebusan kecambah dan limbah cair tahu. Pemilihan sumber nitrogen tersebut karena isolat HTcUM₁₀ yang diisolasi dari tauco menghasilkan aktivitas protease yang rendah dalam medium produksi yang

mengandung sumber nitrogen pepton (Ramadhan, 2016), maka pepton digunakan sebagai variabel pembanding.

Pertumbuhan bakteri dapat diamati berdasarkan perubahan jumlah sel maupun produksi metabolit primernya seperti protein. Naiola (2002) melaporkan bahwa aktivitas protease bakteri penghasil

protease mulai meningkat setelah hari ke tiga dan stabil pada hari ke 4-6. Aktivitas protease isolat HTcUM_{6,2,2} ditunjukkan pada Gambar 3. Aktivitas protease isolat HTcUM_{6,2,2} tertinggi pada hari ketiga dalam semua jenis sumber nitrogen yang digunakan dan menurun secara signifikan pada hari keempat.



Gambar 3. Aktivitas protease Isolat HTcUM_{6,2,2} pada hari ke-3,4,5 dan 6 dalam media produksi dengan sumber nitrogen yaitu: air rebusan kecambah, bubuk kedelai, kasein, pepton, susu skim, limbah cair tahu.

Jenis sumber nitrogen dalam masing-masing media produksi mempengaruhi jumlah protein terlarut (Tabel 1). Bubuk kedelai, susu skim, kasein dan pepton memiliki kadar protein terlarut rendah. Protein dalam bubuk kedelai yang berupa tepung, kasein dan pepton diduga mengandung protein yang kurang larut dalam air. Air rebusan kecambah dan limbah cair tahu memiliki kadar protein terlarut yang paling tinggi. Hal tersebut

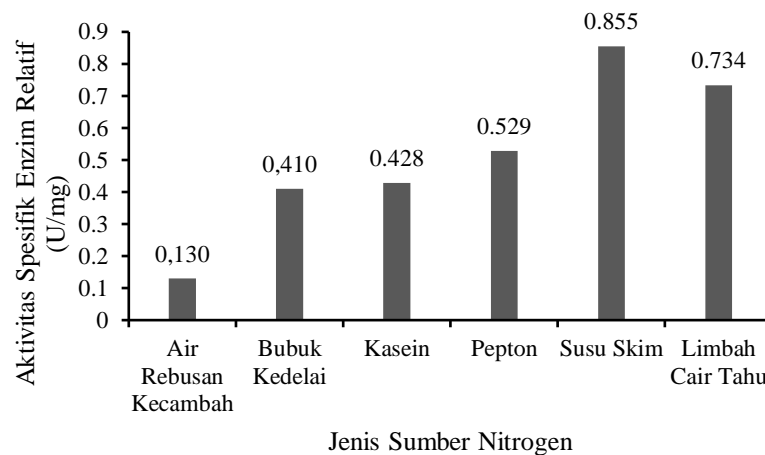
diduga karena pada proses perebusan kecambah melarutkan protein yang terkandung didalam kecambah. Limbah cair tahu merupakan filtrat hasil penyaringan koagulan dari fermentasi susu kedelai sehingga diduga banyak mengandung protein berupa polipeptida pendek yang lebih larut di dalam air dibandingkan protein berukuran besar seperti pepton maupun kasein

Tabel 1. Kadar protein terlarut dalam bubuk kedelai, susu skim, kasein, pepton, limbah cair tahu, dan air rebusan kecambah

Jenis Sumber Nitrogen	Kadar Protein Terlarut (mg/mL)
Bubuk Kedelai	1,835
Susu Skim	2,356
Kasein	2,388
Pepton	2,833
Limbah Cair Tahu	3,245
Air Rebusan Kecambah	3,532

Hasil penelitian menunjukkan jenis sumber nitrogen sangat mempengaruhi aktivitas spesifik protease relatif yang dihasilkan dari isolat HTcUM_{6.2.2} (Gambar 4). Aktivitas spesifik protease relatif merupakan aktivitas enzim dibagi dengan kadar protein terlarutnya. Aktivitas protease relatif isolat HTcUM_{6.2.2} dengan sumber nitrogen air rebusan kecambah paling rendah hanya sebesar 0,130 U/mg padahal air rebusan kecambah memiliki kadar protein terlarut tertinggi. Air rebusan

kecambah diperoleh dengan merebus kecambah dalam air mendidih selama 10 menit, diduga protein yang terlarut dari proses ini masih merupakan protein kompleks dengan rantai polipeptida yang panjang sehingga bakteri membutuhkan waktu yang lebih lama dalam mencerna protein-protein yang masih kompleks tersebut sebagai sumber nutrisi untuk proses pertumbuhan termasuk produksi proteasenya.



Gambar 4. Aktivitas protease spesifik relatif isolat HTcUM_{6.2.2} dalam berbagai jenis sumber nitrogen

Aktivitas protease spesifik relatif yang dihasilkan dalam medium produksi dengan sumber nitrogen bubuk kedelai, kasein dan pepton memiliki aktivitas protease dengan kategori sedang. Aktivitas protease spesifik relatif dengan sumber nitrogen pepton memiliki aktivitas yang lebih tinggi (0,529 U/mg) dibandingkan kasein (0,428 U/mg) dan bubuk kedelai (0,410 U/mg). Hal ini disebabkan pepton merupakan hasil hidrolisis protein hewani, sehingga panjang rantai polipeptidanya lebih pendek daripada kasein maupun protein yang terdapat dalam bubuk kedelai. Aktivitas spesifik protease yang tertinggi dihasilkan dalam medium produksi yang mengandung sumber nitrogen berupa susu skim (0,855 U/mg) dan limbah cair tahu (0,734). Susu skim dan limbah cair tahu merupakan sumber nitrogen alamiah yang lebih kaya nutrisi dibandingkan sumber

nitrogen lainnya. Susu skim selain mengandung protein utama berupa kasein juga mengandung beberapa protein lain, laktosa, dan beberapa asam lemak. Limbah cair tahu merupakan filtrat penyaringan koagulan hasil fermentasi susu kedelai diduga mengandung berbagai nutrisi lain yang lebih mudah dicerna seperti oligosakarida dan polipeptida pendek. Isolat HTcUM_{6.2.2} mampu menghasilkan protease tertinggi dalam media produksi mengandung susu skim, tetapi untuk pengembangan ke skala industri maka penggunaan susu skim kurang efisien secara ekonomis karena harga media produksi menjadi sangat mahal. Limbah cair tahu lebih potensial digunakan sebagai sumber nitrogen karena ditinjau dari nilai ekonomis. Protease yang dihasilkan dalam media produksi cukup sebanding dengan protease yang dihasilkan dalam medium

mengandung susu skim. Jumlah limbah cair tahu melimpah karena banyaknya industri tahu yang ada di Kota Malang sehingga mudah didapatkan dan tidak termanfaatkan.

Optimasi Kadar Sumber Nitrogen untuk Produksi Protease dari Isolat HTcUM_{6.2.2}

Optimasi produksi protease dari isolat HTcUM_{6.2.2} pada tahap ini dilakukan

dengan memvariasikan kadar sumber nitrogen yang terdapat dalam medium produksi. Aktivitas protease hasil optimasi kadar sumber nitrogen disajikan pada Tabel 2. Peningkatan jumlah limbah cair tahu dalam medium produksi sebanding dengan peningkatan kadar proteinnya. Hal ini menunjukkan bahwa dengan kadar sumber nitrogen yang semakin tinggi maka pertumbuhan bakteri juga semakin tinggi.

Tabel 2. Aktivitas Protease Hasil Optimasi Kadar Sumber Nitrogen

Medium Produksi			Enzim	
Kadar Limbah Cair Tahu (%)	Kadar Protein Terlarut (mg)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik Enzim (U/mg)
1	0,325	0,051 ± 0,000	0,022 ± 0,004	2,381 ± 0,397
5	1,623	0,154 ± 0,073	0,047 ± 0,000	3,279 ± 1,555
10	3,245	0,817 ± 0,118	0,070 ± 0,006	11,65 ± 1,834
15	4,868	0,071 ± 0,064	0,104 ± 0,004	0,664 ± 0,576

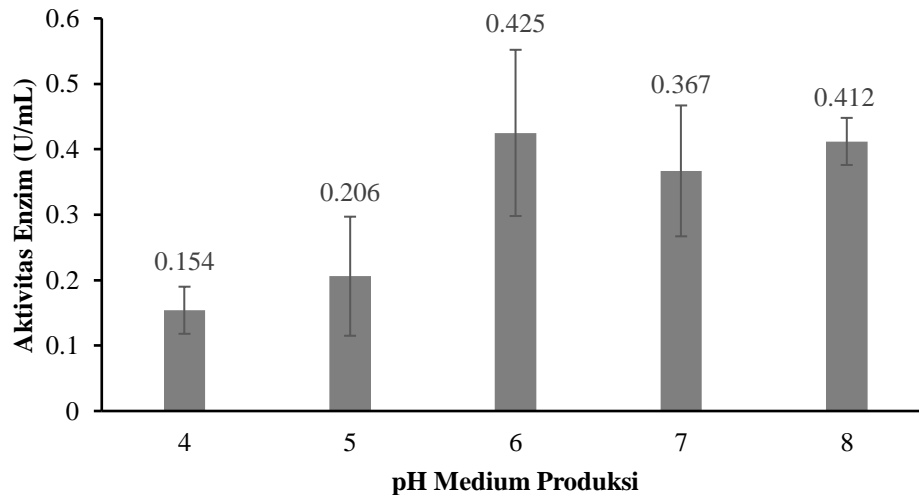
Namun hubungan tersebut tidak linier pada aktivitas enzim. Peningkatan jumlah limbah cair tahun meningkatkan aktivitas protease yang dihasilkan hingga penggunaan 10%, tetapi pada kadar diatasnya yaitu 15% aktivitas protease menurun drastis. Hal ini kemungkinan pada kondisi tersebut terdapat senyawa yang dapat menghambat ekspresi gen protease, sehingga walaupun jumlah protein ekstrak selular meningkat tetapi aktivitas protease yang dihasilkan menurun. Hal ini dikuatkan oleh nilai aktivitas spesifik protease yang juga menurun drastis pada penggunaan limbah cair tahu sebesar 15%. Maka penggunaan 10% limbah cair tahu mampu menghasilkan protease optimum dari isolat HTcUM_{6.2.2} dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0,817 ± 0,118 U/mL dan aktivitas spesifik enzim sebesar 11,65 ± 1,834 U/mg.

Optimasi pH Medium untuk Produksi Protease dari Isolat HTcUM_{6.2.2}

Secara umum, pH medium mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

Pertumbuhan bakteri sejalan dengan aktivitas yang dihasilkan. Setiap enzim memiliki pH medium optimum yang bervariasi. Pada pH medium optimumnya, aktivitas enzim yang dihasilkan lebih tinggi dari pH lainnya. Produksi protease dari isolat HTcUM_{6.2.2} dilakukan dengan variasi pH medium pada pH 4, 5, 6, 7, dan 8 untuk mengetahui pH optimum aktivitasnya seperti yang ditunjukkan Gambar 5.

Isolat HTcUM_{6.2.2} menghasilkan aktivitas protease yang relatif rendah pada pH 4 dan 5, dan relatif tinggi pada pH 6, 7, dan 8. Bahkan pada pH 6,7 dan 8, besarnya aktivitas protease yang dihasilkan tidak berbeda secara signifikan. Berdasarkan hasil ini diduga isolat HTcUM_{6.2.2} merupakan bakteri proteolitik netral. Sifat ini membawa keuntungan bahwa penjagaan kondisi pH untuk produksi protease isolat HTcUM_{6.2.2} tidak terlalu ketat pada suatu pH tertentu tetapi ada dalam suatu rentang yang cukup lebar yaitu 6 hingga 8



Gambar 5. Aktivitas protease isolat HTcUM_{6.2.2} pada berbagai variasi pH

Kesimpulan

Jenis sumber nitrogen terbaik untuk produksi protease dari isolat HTcUM_{6.2.2} adalah susu skim dan limbah cair tahu, tetapi limbah cair tahu lebih potensial digunakan sebagai sumber nitrogen karena lebih murah dan mudah diperoleh. Kadar

limbah cair tahu optimum untuk produksi protease dari isolat HTcUM_{6.2.2} yaitu 10%. Aktivitas protease tertinggi sebesar 0,817 U/ml dicapai dengan penggunaan 10% limbah cair tahu pada medium produksi, pH = 7 selama 3 hari.

Daftar Pustaka

- Ahmed, I., Irfan M., Nadeem, M., Zia M. A., Ahmad B. A. & Iqbal H. M. N. 2010. Optimization of Media and Environmental Conditions for Alkaline Protease Production Using *Bacillus Subtilis* in Submerged Fermentation Process. *Journal of IJAVMS*, 4 (4) :105-113.
- Alnahdi, H. S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp environmental samples and screened their capability of protease. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (9): 71–74.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Sidoarjo. 2016. *Statistik Daerah Kabupaten Sidoarjo*, (Online), (<https://www.scribd.com/document/327540037/Statistik-Daerah-Kabupaten-Sidoarjo-2016>), diakses 12 Maret 2017.
- Buckle, K.A., Edward, R.A., Fleet, G.H. & Wooton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh H. Purnomo & Adiono. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Chu, W. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *Journal of J Ind Microbiol Biotechnol*, 34 : 241–245.
- Naiola, E. & Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, seleksi dan optimasi produksi protease dari beberapa isolat bakteri. *Jurnal Berita Biologi*, 6 (3): 467-473.
- Nurhayati, T., Ibrahim, B., Suptijah, P., Salamah, E., Fitra, R. N., Astuti, E. R. W. 2015. Karakterisasi Pepton Ikan Hasil Tangkap Sampingan Tidak Layak Konsumsi sebagai Sumber Nutrien Pertumbuhan Mikroorganisme. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 25 (1) : 68-77.

- Ounis, W. B., Champagne, C. P., Makhlouf, J. & Bazinet, L. 2008. Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. *Journal of Desalination*, 229 : 192–203.
- Pakpahan, R. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara*. Tesis tidak diterbitkan. Medan : Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Pelczar, M. J. Jr., & Chan, E. C. S., 2010. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press
- Ramadhan, H.R. 2016. *Isolasi Bakteri Penghasil Protease dari Pangan Fermentasi Tauco sebagai Sumber Protease Untuk Isolasi Kolagen secara Enzimatis dari Sisik Ikan Bandeng*. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: S1 Kimia Universitas Negeri Malang.
- Suhaidi, I. 2003. Pengaruh Lama Perendaman Kedelai dan Jenis Zat Penggumpal Terhadap Mutu Tahu. Sumatera Utara : Universitas Sumatera Utara.
- Tiyono, A. 2010. Mempelajari Pengaruh Penambahan Beberapa Asam pada Proses Isolasi Protein terhadap Tepung Protein Isolat Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus L.*). Seminar Rekayasa Kimia dan Proses, 4-5 Agustus 2010.
- Yang, H. & Shu, Z. 2014. The extraction of collagen protein from pigskin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6 (2): 683–687.