Jurnal Kimia Andalas, Vol. 5, No. 2, Tahun 1999 *ISSN : 0853-8018*

FRAKSINASI DAN KARAKTERISASI PROTEASE EKSTRASELULER DARI ASPERGILLUS NIGER

Marnisti Salim, Abdi Dharma, Febriani

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas Padang, 25163

INTISARI

Enzim protease ekstraselular dari *Aspergillus niger* telah diproduksi dari fermentasi tepung jagung dan kemudian difraksinasi secara pengendapan dengan aseton dingin. Aktifitas enzim protease didalam medium fermentasi dipantau setiap 10 jam. Selanjutnya enzim protease dikarakterisasi yang meliputi pH dan suhu optimum untuk aktifitas enzim. Parameter kinetika enzim (nilai K_m dan V_{max}) terhadap substrat kasein juga ditentukan.

Aktifitas enzim protease ditemukan maksimum pada medium 65 jam fermentasi. Protease ekstra selular *A. niger* aktif optimum pada pH 3 dan suhu 50 °C. Nilai K_m dan V_{max} dengan kasein adalah 0,44% dan 0,04 mol $L^{-1}min^{-1}$

ABSTRACT

Extracellular protease of *Aspergillus niger* have been produced by fermentation of maize flour, and then fractionated by precipitation with chilled acetone. The activity of protease in fermentation medium was monitored every 10 hr. Next, the protease was characterized, including optimum pH and temperature for enzymatic activity. Parameter of enzyme kinetic (K_m and V_{max}) were also determined.

Protease enzymatic activity was found to be maximum in medium of 65 hr-fermentation. Activity of extracellular protease of *A. niger* was optimum at pH 3 and 50 °C. The K_m and V_{max} of protease on casein as substrata were 0.44% and 0,04 mol $L^{-1}min^{-1}$

PENDAHULUAN

Enzim protease merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan untuk berbagai keperluan. Protease dari *Bacillus amyloliquefacients* (1), *Bacillus subtilis* (2), digunakan dalam proses perontokan bulu kulit hewan dalam industri kulit. Protease juga digunakan dalam industri makanan seperti dalam pembuatan hidrolisat protein untuk meningkatkan nilai nutrisi dari protein (3). Endothiapepsin, suatu protease aspartat yang di sekresikan oleh *Cryphonectria parasitica*, mempunyai aktifitas penggumpal susu dan digunakan dalam industri keju.(4). Protease dari *Bacillus licheriformis* termofilik sudah dikembangkan untuk merubah bulu dan kulit limbah perternakan menjadi lisat kulit dan bulu yang dapat dicerna sebagai bahan pakan ternak. Keratinase yang diekskresikan oleh bakterium *B. licheriformis* merupakan protease kuat yang dapat menghidrolisa berbagai jenis protein termasuk collagen, elastin, dan keratin bulu. Enzim ini dapat meningkatkan pencernaan bulu sehingga bisa diberikan sebagai pakan ternak (5). Suatu

bakterium berspora Gram-positif yang diisolasi dari sumber air panas, aktif pada suhu 55 °C dan juga dapat mencerna kulit, bulu dan tanduk (6). Protease alkali sudah digunakan untuk bahan additive detergen untuk meningkatkan kemampuan detergent dalam membersihkan noda protein.

Protease alkali yang diisolasi dari strain alkalifilik micobacterium (7), dari insek *Spilosoma obliqua* (8) dari bakteria pada marine shipworm (9) berpotensi sebagai bahan tambahan detergen untuk meningkatkan daya membersih dari detergen.

Dari namanya, dapat diketahui bahwa protease adalah suatu enzim yang bekerja menghidrolisa protein. Protease merupakan enzim yang umum didapatkan didalam organisme. Namun protease dari suatu organisme mungkin tidak sama dengan protese dari organisme lainnya. Bahkan didalam suatu organisme didapatkan protease yang berbeda. Untuk pemakaian dalam bidang bioteknologi industri atau lingkungan diperlukan protease yang sesuai dengan kondisi aplikasi, seperti protease untuk bahan campuran detergen harus bisa bekerja dalam lingkungan detergen yang bersifat basa.

Mempertimbangkan potensi dari proteinase dalam industri dan pangan, maka dilakukan studi tentang protease ekstra seluler dari *Aspergillus niger* galur liar isolat dari alam sekitar kampus Unand Limau Manis. *A. niger* merupakan kapang industri yang lebih dikenal sebagai penghasil asam sitrat. Namun galur atau isolat yang berbeda bisa saja mempunyai keunggulan yang berbeda.

METODOLOGI

Bahan

A. niger galur liar isolat dari Kampus Unand Limau Manis, medium PDA, medium fermentasi, bufer glisin, aseton, Trichloroacetic acid (TCA), reagen Lowry, reagen folinciocalteu, albumin serum bovin (bovin serum albumin, BSA), alkohol, tirosin dan NaOH

Metoda

Produksi Protease dari A. niger

Protease diproduksi dengan fermentasi pati jagung oleh *A. niger*. Medium fermentasi (1 L) terdiri dari pati (30 g) dan minyak (5 g) jagung, tepung kacang kedelai (10 g), kasein (20 g, gelatin (2 g), ekstrak ragi (2 g), dan mineral. Fermentasi dimulai dengan menambahkan 3% biakan aktif (germiling umur 24 jam) *A. niger* kedalam media fermentasi, kemudian dikocok dengan heker. Fermentasi dilakukan pada pH 5 (pH medium pada awal fermentasi), dan suhu ruangan. Aktifitas enzim protease didalam medium fermentasi dipantau setiap 10 jam sampai jam ke 70 dengan metoda Anson (10).

Ekstraksi dan Fraksinasi Protein dari Medium Fermentasi

Campuran fermentasi disaring dengan kain kasa, dan filtratnya disentrifus (5000 rpm, 10 min) dan selanjutnya disaring kembali dengan kertas Whatman no 42, dan filtratnya disebut ekstrak kasar protease. Ekstrak kasar enzim hasil fermentasi selama 65 jam (aktifitas protease maksimum), difraksinasi dengan aseton dingin (0-10%, 20-40%), 40-60%, dan 60-80% kejenuhan). Kedalam ekstrak kasar enzim dingin ditambahkan aseton dingin sedikit demi sedikit hingga tercapai prosentase kejenuhan yang diingini. Penambahan aseton dilakukan sambil diaduk dengan kecepatan rendah, dan pengadukan diteruskan sampai 10 min setelah penambahan aseton selesai, kemudian campuran dibiarkan tenang selama 30 min, untuk selanjutnya disentrifus pada 5000 rpm selam 10 min. Aktifitas protease didalam endapan diuji dengan metoda Anson (10) setelah endapan dilarutkan dalam bufer glisin, pH 3.

Penentuan Kondisi Optimum Enzim Protease

Fraksi yang mempunyai aktifitas protease tertinggi diuji sifat-sifatnya yang meliputi suhu dan pH optimum protease. Suhu optimum reaksi enzimatik yang dikatalis protease dilakukan dengan melansungkan reaksi pada suhu bervariasi yaitu dalam rentangan 25-65 °C. Aktifitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat dilakukan pada suhu optimum aktifitas enzim. Penetuan pH optimum aktifitas protease dilakukan dengan menguji aktifitas enzim pada rentangan pH 2,4-3,4 dengan interval 0,2 satuan pada suhu dan konsentrasi substrat optimum. Waktu reaksi (inkubasi) optimum ditentukan dengan melakukan reaksi dalam rentangan waktu 2-25 min. Substrat dari reaksi enzimatik yang digunakan adalah casein

Penentuan Aktifitas Enzim Protease.

Aktifitas enzimatik protease ditentukan menurut Metoda Anson, secara ringkas sebagai berikut. Campuran reaksi (2,5 ml casein 2,5%, 1,5 ml bufer glisina pH 3) dipreinkubasi pada 37 °C, 10 min. Reaksi dimulai dengan memasukkan 1 ml preparat enzim kedalam campuran reaksi dan dihentikan setelah waktu yang ditentukan dengan penambahan 5 ml trichloro acetic acid (TCA) 30%. Setelah pendinginan, campuran reaksi disentrifus pada 5000 rpm, 10 min. Supernatan (2ml) ditambah dengan 5 ml NaOH 0,5 M dan 1 ml reagern Folin ciocalteu. Setelah 10 min serapan dari campuran reaksi terakhir diukur pada 650 nm. Konsentrasi dari produk reaksi (tirosin) ditentukan dengan menggunakan kurva standar larutan tirosin.

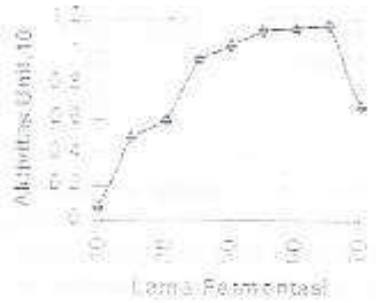
Penetuan Konsentrasi Protein.

Konsentrasi proten dilakukan menurut metoda Lowry. Preparat enzim (1 ml) direaksikan dengan 5 mL reagen Lowry selama 10 min, kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen Folin ciocalteu. Setelah 10 meniit, serapan diukur pada 720 nm. Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva larutan standart dari protein bovin serum albumin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pola Waktu Produksi Protease oleh A. niger

Aktifitas protease terlihat meningkat mulai hari ke 10 sampai jam ke 65 fermentasi. Setelah hari ke 65 aktifitas protease mulai menurun (Gambar 1).



Gambar 1. Penentuan lama konsentrasi

Didalam medium fermentasi dimasukkan kasein yang merupakan substrat dari protease. Kasein dilaporkan bersifat sebagai induser bagi protease ekstraselular pada mikroba tetentu. Disangka bahwa kasein yang merupakan inducer protease pada jam ke 65 sudah mulai habis sehingga kecepatan produksi protease mulai rendah dari kecepatan pemecahannya. Laju pemecahan protease pada saat fermentasi diduga cukup tinggi karena fermentasi dilakukan pada suhu kamar, sehingga protease aktif untuk saling memecah. Pola hubungan antara aktifitas protease dengan lama fermentasi yang diperlihatkan oleh *A. niger* dapat berbeda dengan yang terlihat pada mikroba lain, karena pola waktu

produksi protease sangat tergantung pada strain, dan media yang digunakan (11).

Fraksinasi Protease

Aktifitas protease tidak terlihat pada fraksi yang mengendap dengan 0-20% aseton.(Tabel).

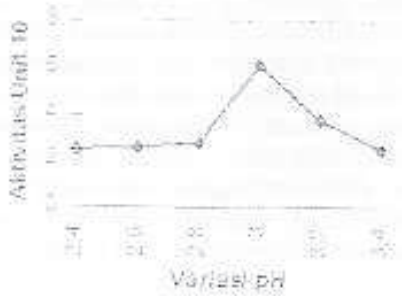
Tabel 1. Fraksinasi Aspergillus niger dengan medium cair

Konsentrasi Aseton (%)	Aktifitas Spesifik (unit/ml)
Ekstrak kasar (0%)	$3{,}61 \times 10^{-2}$
F1 (0-20%	0.0
FII (20-40%)	$1{,}12 \times 10^{-2}$
FIII (40-60%)	$1{,}98 \times 10^{-2}$
FIV (60-80%)	$11{,}9 \times 10^{-2}$

Aktifitas spesifik di dalam fraksi yang mengendap dengan 20-40% aseton adalah 1.12×10^{-2} unit/mg protein, yaitu sekitar 31% lebih kecil dari aktifitas spesifik ekstrak kasar ($3{,}61 \times 10^{-2}$ unit/mg). Data ini memperlihatkan bahwa protease lebih banyak terdapat pada fraksi yang tidak mengendap dengan 20-40% aseton. Begitu pula pada fraksi yang mengendap dengan 40-60% aseton tidak terlihat peningkatan aktifitas spesifik protease. Aktifitas spesifik enzim pada fraksi ini hanya 55 % dari aktifitas spesifik protease pada ekstrak kasar. Fraksi yang mengendap pada 60-80% kejenuhan aseton mempelihatkan aktifitas spesifik yang lebih tinggi (3,30 kali) dari dalam ekstrak kasar yaitu 1.19×10^{-1} mg/ml. Namun total aktifitas enzim protease yang ditemukan setelah dalam fraksi ini hanya sekitar 0,13 % dari total aktifitas dalam ekstrak kasar (Data tidak ditampilkan). Jadi aseton 60-80% dapat mengendapkan protease lebih baik, namun tidak cukup baik untuk dijadikan langkah pertama dalam proses pemurnian protease *A. niger* karena hasil yang didapatkan sangat kecil..

pH Optimum untuk Aktifitas Protease

Protease ekstraseluler *A. niger* nampaknya merupakan suatu protease asam, dimana enzim ini memperlihatkan aktifitas tertinggi pada pH 3 (Gambar 3).



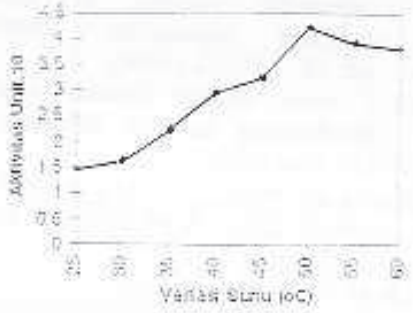
Gambar 2. Variasi pH terhadap aktifitas enzim protease

Protease asam tidak bisa digunakan untuk bahan tambahan detergen, karena detergen bersifat basa. Protease asam cukup berpotensi untuk menurunkan BOD dari air limbah organik. Namun demikian kapang *A. niger* lebih suka hidup menempel pada material padat, sehingga agak sulit untuk dikembangkan untuk menurunkan BOD air limbah..

Suhu Optimum Aktifitas Protease

Aktifitas enzimatik dari protease *A. niger* optimum pada suhu yang cukup tinggi, yaitu 50 °C. (Gambar 4).

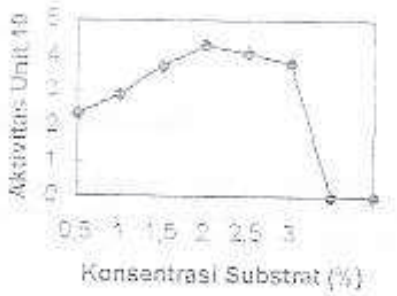
Aktifitas optimum pada suhu tinggi bahkan mencapai 100 °C dapat ditemukan pada mikroba yang hidup pada lingkungan suhu tinggi, dan disebut juga sebagai mikroba termofiilik. Protease dari *Pyrococcus furious*, suatu hipertemofilic mikroba, aktif pada 100 °C (12).



Gambar 3. Variasi suhu terhadap aktifitas enzim protease.

Kinetika Enzim

Dari kurva 1/S VS 1/V dari data hubungan antara kecepatan reaksi dengan konsentrasi substrat didapat nilai K_m dari V_{max} dari protease A. niger, yaitu 0,44% $M.L^{-1}$ min^{-1} berturut-turut. Kurva hubungan antara konsentrasi substrat dengan laju reaksi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Variasi konsentrasi substrat

KESIMPULAN

1. Fraksinasi enzim dengan pengendapan dengan aseton tidaklah cara yang terbaik untuk proses pemurnian protease *A. nige.*
2. Protease ekstraselular *A. niger* adalah protease asam yang aktifitas enzimatiknya maksimum pada pH 3.
3. Protease ekstra selular *A. niger* mempunyai aktifitas yang optimum pada suhu yang cukup tinggi yaitu pada 50 °C.
4. Nilai K_m dan V_{max} dari protease *A. niger* (preparat belum murni) adalah 0,44% dan 0,04 mol $L^{-1}min^{-1}$

DAFTAR PUSTAKA

1. S. George, V. Raju, M.R.V. Krishnan, T.V. Subramanian, K. Jayaraman, Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. Process-biochem,. 30, 457-462. (1995).
2. H. Varela, M.D. Ferrari, L. Belobrajdic, R. Weyrauch, L. Loperena, Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. World-j-microbiol-biotechnol.. 12, 643-645. (1996)
3. B.D Rebeca, M.T, Pena-Vera, M. Diaz-Castoneda, Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. J-Food-Sci-Off-Publ-Inst-Food-Technol. 56. 309-314 (1991)
4. V. Razanamparany, P. Jara, R. Legoux, P. Delmas, F. Msayeh, M. Kaghad,, G. Loison, Cloning and mutation of the gene encoding endothiapepsin from *Cryphonectria parasitica* Curr-Genet.. 21. 455-461 (1992)
5. J.C.H. Shih, Recent development in poultry waste digestion and feather

ISSN : 0853-8018

utilization--a review. Poultry-sci 72,1617-1620 (1993)

6. K. Atalo, B.A. Gashe, Protease production by a thermophilic *Bacillus species* (P-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins, Biotechnol-lett.. 15, 1151-1156. (1993)
7. A. Gessesse, B.A. Gashe, Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake, Biotechnol-lett.. 19, 479-481, (1997).
8. A.Anwar, M. Saleemuddin, Alkaline-pH-acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma obliqua*: stability and potential as detergent additives, Biotechnol-appl-biochem, 25. 43-461 (1997).
9. R.V.Greene, H.L. Griffin, M.A. Cotta, Utility of alkaline protease from marine shipworm bacterium in industrial cleansing applications. Biotechnol-lett..18, 759-764. (1996).
10. F. Boyer, Rodney, Modern Experiment Biochemistry 2nd Ed, Benjamin Pub. Co., Inc (1993).
11. A.L.F. Porto., G. M.Compos-Takaki, and F. Lima., Appl. Biochem. Biotech. 60, 115.,
12. M.W.W. Adam, and R.M. Kelly, Enzymes From Microorganism in Extreem Environment, Chem. & Eng. News, Dec. 8, 1995.