

Pemanfaatan Limbah Tahu sebagai Media Pertumbuhan *Aspergillus flavus* DUCC-K225 untuk Produksi Enzim Protease

Linda Ayu Utami¹⁾ dan Agung Supriyadi¹⁾

¹⁾Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia
E-mail: agungsupriyadi61@gmail.com

ABSTRAK

Protease merupakan salah satu enzim yang memiliki nilai ekonomi tinggi dalam bidang industri, antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, dan pada proses pengolahan limbah industri. Kebutuhan akan protease mencapai 70% dari kebutuhan enzim secara keseluruhan di dunia. Di Indonesia sendiri, kebutuhan akan protease akhir-akhir ini semakin meningkat dan kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor yang menyebabkan ketersediaan enzim protease ini menjadi sangat penting. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut adalah dengan mengupayakan untuk memproduksi enzim protease dengan memanfaatkan sumber daya hayati yang dimiliki oleh Indonesia. Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri, umumnya diproduksi dari mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme yang potensial sebagai penghasil enzim protease alkalis yaitu kapang indigenous *Aspergillus flavus* DUCC-K225 yang di isolasi dari tanah kapur di Desa Sukolilo Barat Madura. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji produksi enzim protease alkalis termostabil dari *Aspergillus flavus* DUCC-K225 dengan menggunakan media alternatif limbah tahu sebagai pengganti sumber nitrogen sehingga didapatkan produksi protease alkalis yang lebih ekonomis dan dapat diproduksi dalam skala besar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media limbah tahu dapat digunakan sebagai substrat alternative produksi enzim protease. Hal ini ditunjukkan dari berkurangnya biomas substrat tahu yang digunakan untuk pertumbuhan jamur *A.flavus*. Produksi enzim meningkat sebanyak 336.202 U/ml/menit, dengan peningkatan nilai aktivitas spesifik enzim sebesar 4.52 U/mg.

Kata kunci : *Aspergillus flavus* DUCC-k225, enzim protease, industri, limbah tahu

ABSTRACT

Protease is an enzyme with high economic value in the industry, which is used in detergent, leather, textile, food, dairy products, pharmaceutical, and also during industrial waste processing. The need for proteases reaches 70% of the overall enzyme needs in the world. While in Indonesia, the need for protease has recently increased but the demand is still dependent on the imported production. An approach to anticipate the dependence on imports is by producing protease enzymes by utilizing biological resources obtained in Indonesia. The protease enzyme used in the industrial field is generally produced from microorganisms. One of the potential microorganisms as alkaline protease enzyme producer is indigenous mold *Aspergillus flavus* DUCC-K225 which is isolated from lime soil in West Sukolilo Village in Madura. This study aimed to examine the production of thermostable alkaline protease enzyme from *Aspergillus flavus* DUCC-K225 by using an alternative media of tofu waste as a substitute for nitrogen source. The results showed that the tofu waste media could be used as an alternative substrate to produce protease enzyme. The enzyme production increased to 336,202 U/ml/minute, with an increasing of enzyme specific activity of 4.52 U / mg.

Key words : *Aspergillus flavus* DUCC-k225, protease enzyme, industry, tofu waste

1. Pendahuluan

Salah satu produk bioteknologi yang menjadi primadona sekarang ini adalah enzim. Enzim merupakan biokatalis yang beragam bentuk, ukuran, sifat, dan peranannya dalam sel. Berdasarkan peranan enzim dalam sel hewan, tumbuhan dan mikroba, maka enzim

berperan dalam setiap reaksi biokimia, yaitu mulai dari konversi energi, metabolisme makanan, mekanisme pertahanan sel, komunikasi antar sel hingga konversi sifat-sifat keturunan. Karena itulah enzim mempunyai potensi bioteknologi yang tinggi dan dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri (Suhartono, 2000).

Protease merupakan enzim penting yang digunakan secara luas pada aplikasi industri melalui reaksi sintesis dan reaksi hidrolisis, hampir mencapai 65% dari total penjualan enzim di dunia (Huang 2006). Salah satu jenis enzim yang aplikasinya sangat luas adalah enzim protease karena memiliki nilai ekonomi yang tinggi dalam bidang industri, antara lain industri deterjen, kulit, tekstil, makanan, pengolahan susu, farmasi, dan pada proses pengolahan limbah industri (Nascimento WCA, 2006).

Di Indonesia kebutuhan akan enzim protease semakin meningkat, namun kebutuhan ini masih tergantung pada produksi impor. Salah satu cara mengantisipasi ketergantungan terhadap impor tersebut adalah dengan mengupayakan untuk memproduksi enzim protease dengan mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya hayati yang dimiliki oleh Indonesia (Suhartono, 2000). Enzim protease dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan maupun mikroorganisme. Enzim yang berasal dari tanaman maupun hewan memiliki kelemahan apabila digunakan atau diproduksi, hal tersebut dikarenakan jaringan pada tanaman mengandung bahan yang berbahaya, seperti senyawa fenolik, faktor fisiologi pada organisme yang membutuhkan waktu sangat lama dan adanya inhibitor enzim. Enzim protease yang digunakan dalam bidang industri umumnya diproduksi dari mikroorganisme. Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim protease mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah.

Berdasarkan permasalahan akan tingginya kebutuhan enzim protease di Indonesia, maka penelitian bertujuan untuk melakukan produksi enzim protease alkalis yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* DUCC-K225 dengan cara mengubah medium produksi menggunakan limbah tahu yang relative lebih murah dan mudah untuk didapatkan. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pemanfaatan isolat kapang *Aspergillus flavus* DUCC-K225 alkalotoleran indigenous untuk membantu kebutuhan enzim protease alkalis dalam berbagai industri.

2. Metode

2.1. Pembuatan Larutan *Skim Milk*

Sebanyak 20 gram bubuk *skim milk* dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 100mL. Kemudian larutan *skim milk* dituang ke dalam 20 tabung tutup ulir dengan volume masing-masing 5mL, selanjutnya di-*pasteurisasi* pada suhu 60-70 °C dalam waktu 1 jam. Larutan *skim milk* di-*pasteurisasi* selama 3 hari berturut-turut dengan perlakuan yang sama, dan kemudian disimpan di dalam kulkas.

2.2. Pembuatan Inokulum

Kultur Jamur *Aspergillus flavus* DUCC-K225 diinokulasi pada medium PDA dengan menggunakan ose tajam steril. *A. flavus* DUCC-K225 yang telah diinokulasi, kemudian diremajakan selama 5-7 hari pada suhu ruang ($\pm 37^{\circ}\text{C}$). Untuk memproduksi konidia pada media miring PDA. Panen konidi dengan cara menambahkan akuades yang berisi 0,01% Tween 80 hingga kepadatan $10^8/\text{ml}$.

2.3. Pembuatan Media Fermentasi Limbah Tahu

Sebanyak 40 ml limbah tahu; 0,2 gram KCl; 0,004 gram FeSO_4 ; 0,2 gram MgSO_4 ; 0,4 gram K_2HPO_4 ; 0,8 gram NaNO_3 dan 65 ppm Chloramphenicol dilarutkan dalam 340 ml akuades steril. Media yang telah homogen dimasukkan sebanyak 95 ml ke dalam 4 erlenmeyer, selanjutnya disterilisasi pada *autoclave*. *Skim milk* ditambahkan sebanyak 5 ml ke dalam masing-masing media. NaOH 1 N sebanyak 1500 μL ditambahkan ke dalam media untuk mencapai derajat keasaman (pH) sebesar 9,0.

2.4. Produksi Enzim

Sejumlah 1% v/v suspensi spora ($10^8/\text{ml}$) *A. flavus* diinokulasikan ke dalam 3 erlenmeyer yang berisi medium standar dengan sumber N (nitrogen) limbah tahu. Media limbah tahu dan kultur *Aspergillus flavus* DUCC-K225 diinkubasi di *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 7 hari. Kultur *A. flavus* DUCC-K225 yang telah melalui tahap fermentasi disaring dengan menggunakan kertas Whatman No. 1. Supernatan yang diperoleh disentrifugasi menggunakan

sentrifugator pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang didapatkan disimpan dalam lemari pendingin untuk dihitung kadar protein dan aktivitas enzimnya. Propagul yang tersaring dikeringkan di oven pada suhu 70°C selama 3x24 jam, dan ditimbang menggunakan neraca digital.

2.5. Pengukuran Kadar Protein

Reagen Lowry A merupakan campuran 10 ml folin 2N dan 10 ml akuades steril. Reagen Lowry B merupakan campuran 5 gram Na₂CO₃ dan 250 ml NaOH 1M, yang kemudian ditambahkan 2,5 ml CuSO₄ 1% dan 2,5 ml KNa Tartrat 2%. Supernatan fermentasi diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 10 menit, dan kemudian ditambah dengan 3 ml TCA 10%. Sejumlah 1 ml larutan tersebut ditambah dengan 5 ml Na₂CO₃ 0,4 M dan 0,5 ml fenol 0,5 M, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 20 menit. Larutan tersebut diukur aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 660 nm sebanyak 0,05 ml diencerkan dalam 4,95 ml Tris HCl 0,1 M dengan pH 8,6. Sejumlah 5 ml larutan sampel tersebut ditambah dengan 8 ml Lowry B dan didiamkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 ml Lowry A, lalu didiamkan selama 20 menit. Larutan tersebut dihitung kadar proteinnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 600 nm.

2.6. Pengukuran Aktivitas Enzim

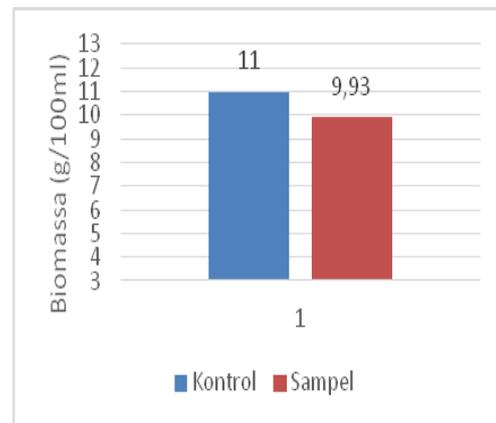
Supernatan fermentasi sebanyak 0,05 ml diencerkan dalam 4,95 ml Tris HCl 0,1 M dengan pH 8,6. Larutan sampel sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam 1 ml kasein 2% (dalam buffer Tris HCl 0,1 M dengan pH 8,6). Larutan tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 10 menit, dan kemudian ditambah dengan 3 ml TCA 10%. Sejumlah 1 ml larutan tersebut ditambah dengan 5 ml Na₂CO₃ 0,4 M dan 0,5 ml fenol 0,5 M, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 20 menit. Larutan tersebut diukur aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 660 nm.

3. Hasil dan Pembahasan

Tabel 1. Hasil pengukuran biomassa sampel limbah tahu.

Sampel	Berat Kertas Saring (g)	Berat Kering (g)	Biomassa (g/100 ml)
L-1	0.68	1.64	9.6
L-2	0.82	1.68	8.6
L-3	0.52	1.68	11.6
Rata-rata	0,67	1.66	9.93

Perbandingan biomassa perlakuan dengan biomassa kontrol dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram perbandingan biomassa sampel dengan kontrol.

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa biomassa sampel lebih rendah dari biomassa kontrol yaitu sebesar 0,93g/100ml, hal tersebut disebabkan karena adanya penggunaan sumber nitrogen oleh jamur *Aspergillus flavus* DUCC-K225 untuk pertumbuhannya sehingga semakin lama media akan kekurangan sumber nitrogen yang akan menyebabkan berkurangnya biomassa jamur *A. flavus* DUCC-K225. Menurut (Sutanto, 2015) bahwa di dalam limbah cair industri tahu masih terdapat komponen organik yang diperlukan jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) sebagai nutrisi pertumbuhan seperti protein, karbohidrat dan lemak. Selain itu, di dalam limbah cair industri tahu tersebut juga terdapat kadar nitrogen 40%/liter yang berfungsi untuk sintesis protein. Dengan adanya komponen organik dalam limbah cair industri tahu ini diharapkan dapat mempercepat pertumbuhan miselium dan produksi jamur tiram putih yang optimal.

Hasil pengukuran aktivitas enzim protease menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang (λ) 660 nm didapatkan

hasil absorbansi yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Absorbansi produksi enzim protease gelombang (λ) 660 nm.

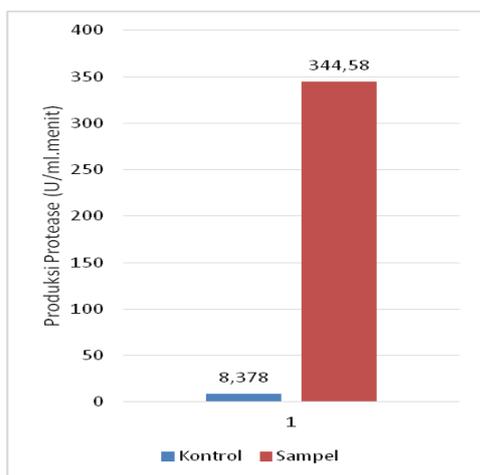
Sampel	Absorbansi (y)
L-1	0.336
L-2	0.568
L-3	0.466

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, didapatkan data aktivitas enzim protease dari jamur *Aspergillus flavus* DUCC-25 pada setiap sampel sebagaimana tertampil di Tabel 3.

Tabel 3. Produksi enzim protease pada setiap sampel.

Sampel	Aktivitas Enzim (Unit/ml.menit)
L-1	249.65
L-2	432.18
L-3	333.04
Rata-rata	344.58

Hasil produksi enzim protease dari ketiga sampel perlakuan dibandingkan dengan produksi enzim pada medium kontrol yang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 3. Diagram perbandingan kadar protein perlakuan dengan kontrol.

Berdasarkan hasil perbandingan kadar protein tersebut dapat diketahui bahwa kadar protein yang terkandung dalam enzim pada perlakuan pertama sampai ketiga menunjukkan hasil yang sangat tinggi dibandingkan dengan

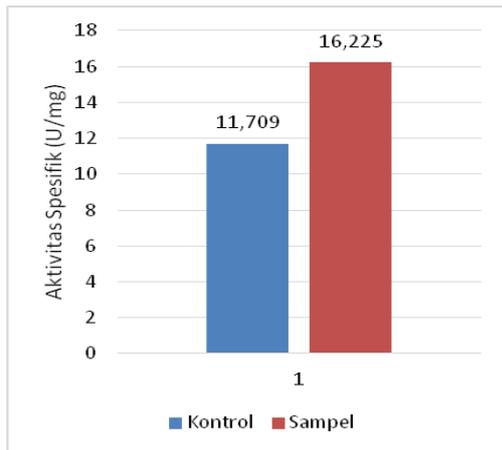
kadar protein pada medium kontrol. Menurut (Sugiharto, 1994) bahan-bahan yang terkandung di dalam limbah industri cair tahu pada umumnya sangat tinggi. Senyawa-senyawa organik yang tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, dan lemak. Senyawa protein memiliki jumlah yang paling besar yaitu mencapai 40-60%, karbohidrat 25-50%, dan lemak 10%. Bertambah lama bahan-bahan organik dalam limbah cair tahu, maka volumenya semakin meningkat. Menurut (Wu TY, 2006) mikroba protease spesies *Aspergillus*, khususnya, telah dipelajari secara rinci karena mereka dikenal karena kemampuannya untuk mengeluarkan enzim dalam tingkat tinggi di lingkungan pertumbuhannya. Beberapa enzim yang disekresikan ini, diproduksi dalam fermentasi terendam skala besar, telah banyak digunakan di industri makanan dan minuman selama beberapa dekade. Contoh spesies adalah *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*.

Setelah mengetahui aktivitas enzim dan Kadar protein dari ketiga sampel dengan perlakuan pemberian limbah tahu pada media sebagai pengganti $\text{Na}(\text{NO}_3)$ yang berperan sebagai sumber N, maka dapat diketahui aktivitas spesifiknya. Hasil aktivitas spesifik dari ketiga sampel dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Aktivitas spesifik sampel (unit/mg)

Sampel	Aktivitas Spesifik (Unit/mg)
L-1	5.44
L-2	15.32
L-3	17.13

Hasil pengukuran aktivitas spesifik dari ketiga sampel dalam perlakuan medium menggunakan limbah tahu sebagai pengganti sumber N (nitrogen) di atas secara berurutan yaitu L-1 sebesar 5.44 U/mg, L-2 sebesar 15.32 U/mg dan L-3 sebesar 17.13 U/mg, karena hasil L-1 terlalu rendah, maka yang menjadi perbandingan altivitas spesifik yang dipakai adalah sampel L-2 dan L-3 dengan rata-rata hasil aktivitas spesifik sebanyak hasil tersebut kemudian dibandingkan dengan aktivitas spesifik yang dihasilkan pada medium kontrol yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Perbandingan aktivitas spesifik sampel dengan kontrol.

Aktivitas spesifik medium limbah tahu sebesar 16.225 U/mg dibandingkan dengan aktivitas spesifik medium standart sebesar 11.709 U/mg, aktivitas spesifik yang tinggi ini kemungkinan disebabkan adanya kandungan protein yang tinggi. Protein yang dihasilkan tidak hanya berasal dari enzimnya melainkan protein yang memang terkandung pada media limbah tahu. Menurut (Febrianti, 2017) protein terdeteksi pada sekitar $17,02 \pm 0,02\%$ (dw) dari pati limbah tahu. Protein, salah satu elemen yang menyusun membran sel, diharapkan menjadi sumber utama nitrogen untuk pertumbuhan mikroorganisme. Kandungan limbah tahu dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Analisis Prosikmat kandungan pada limbah tahu (Sudaryati, 2013).

Component	Composition (%)	
	Literature	Result ^d
Water	5.74 ^a	9.50±0.10
Ash (dw)	9.02 ^a	8.16±0.20
Fat (dw)	14.49 ^a	11.30±0.05
Protein (dw)	10.04 ^a	17.02±0.02
Carbohydrate (dw)	59.95 ^a	54.04±0.03
Starch	11.49 ^b	39.23±0.20
Fiber	19.47 ^c	12.38±0.10
Amylose	No literature	28.09±0.07
Amylopectin	No literature	73.00±0.10

4. Kesimpulan

Limbah tahu dapat digunakan sebagai media alternative produksi enzim protease alkalis oleh jamur *Aspergillus flavus* DUCC-K225. Penggantian sumber Nitrogen dengan limbah tahu pada medium fermentasi dapat meningkatkan produksi protease alkaline.

Produk Ezim protease alkaline meningkat selama fermentasi, dengan peningkatan aktivitas spesifik yang lebih tinggi daripada kontrolnya.

Daftar Pustaka

Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 107–133.

Febrianti, F. (2017). Bioethanol Production From Tofu Waste By Simultaneous Saccharification And Fermentation (Ssf) Using Microbial Consortium . *International Journal of Technology*, 5: 898-908.

Huang G, Y. T. (2006). Purification and Characterization of Protease from Thermophilic *Bacillus* Strain HS08. *African Biotechnol*, 5: 2433-2438.

Imam Chanif, e. a. (2015). Uji Potensi Jamur Pelapuk Putih dalam Bioremediasi. *Jurnal HPT*, Volume 3 Nomor 2 Hlm 83-90.

Isyuniarto, W. U. (2005). Pengolahan Limbah Cair Industri Tahu dengan Teknik Lucutan Plasma. *Pusat Teknologi Akselerator dan Proses Bahan*, Hlm : 20-25.

Kembhavi AA, K. A. (1993). Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No 64. *Appl Biochem Biotechnol*, 38:83–92.

Mohamed Hajji, e. a. (2008). Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in Mirabilis jalapa tuber powder using statistical experimental design. *Appl Microbiol Biotechnol* , 79:915–923.

Nascimento WCA, M. M. (2006). Studies on Stability of Protease from *Bacillus* sp. And its Compatibility with Comercial Detergen37: 307-311. *Brazilia Microbiol*, 37: 307-311.

Nohong. (2010). Pemanfaatan Limbah Tahu Sebagai Bahan Penyerap Logam Krom, Kadmiun dan Besi Dalam Air Lindi TPA. *Jurnal Pembelajaran Sains*, Vol. 6, No. 2: 257-269.

Oludumila Omolara Racheal, A. T. (2015). Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus Niger* isolated from yam peels. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4 (2): 125-131 .

- Pakhpahan, R. (2009). *Isolasi Bakteri & Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara, Sumatera Utara. (Tesis)*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Parathamam, R. A. (2009). Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, Volume 5(3), pp. 308-312.
- Ramírez-Camejo, L. A., Zuluaga-Montero, A., Lázaro-Escudero, M. A., Hernández-Kendall, V. N., Bayman, P., Camejo, R., & Camejo, R. (2012). Phylogeography of the cosmopolitan fungus *Aspergillus flavus*: Is everything everywhere? *Fungal Biology*, 116 (3): 452–463.
- Scheidegger, K. A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 22(2-3): 423-459.
- Sudaryati., M. T. (2013). *Study of the Substitution Tofu Waste and the Use of Sodium Bicarbonate in Tortilla Making. Food Technology Program. Indonesia.: FTI UPN Veteran.*
- Sugiharto. (1994). *Dasar-dasar Pengolahan Air Limbah*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Suhartono, M. (2000). *Exploration Of Indonesian Thermophiles Producing Thermostable Chitinolytic Enzymes*. Bogor: Bogor Agriculture University.
- Sumantha A, C. L. (2006). Microbiology & industrial of foodgrade protease: A perspective. *Food Technology Biotechnology. Food Technology Biotechnology*, 44(2): 211-220.
- Sutanto, Y. I. (2015). *Pengaruh Substitusi Limbah Cair Industri Tahu Pada Media Tanam Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Jamur Tiram Putih (Pleurotus ostreatus) Sebagai Sumber Belajar Biologi*. Universitas Muhammadiyah Metro: Pendidikan Biologi FKIP.
- Triatmojo, A. N. (2004). Penerapan Protease *Aspergillus flavus* pada Proses Buang Rambut Ramah Lingkungan. *Buletin Peternakan*, Vol. 28(4). 193.106.2004.
- Ward, O. (1983). *Proteinase di dalam Microbial Enzyme and Biotechnology*. W. M. Fogarty. New York: Applied Science Publisher.
- Waterborg, J. H. (2002). *The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Wu TY, M. A. (2006). Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzym Microb Technol*, 39:1223–1229.