

Eksplorasi Jamur Proteolitik Alkali Termotoleran Dari Tanah Kapur Sukolilo Barat Madura

Isworo Rukmi¹⁾ & Arina Tri Lunggani¹⁾

¹⁾Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika

Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia

E-mail: isworo.rukmi@gmail.com

ABSTRAK

Peran mikroorganisme di dalam berbagai industri telah sangat dikenal di dunia. Berbagai jenis galur mikroorganisme industri merupakan galur-galur unggul dalam menghasilkan berbagai enzim, terutama mikroorganisme yang tergolong kelompok ekstremofil. Indonesia merupakan negara tropis yang menjadi salah satu sumber mikroorganisme ekstremofil yang dapat memenuhi kebutuhan industri, akan enzim yang bersifat alkalis dan termotoleran. Protease alkalis merupakan salah satu enzim yang penting dalam industri. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi jamur alkalofil termotoleran penghasil protease alkalis dari tanah kapur Desa Sukolilo Barat Madura. Isolasi jamur tanah indigenous dilakukan secara selektif menggunakan medium PDA yang mengandung 2% skim milk pada pH 8. Isolat jamur proteolitik dipelihara dalam medium PDA miring. Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan medium Czapeks Dox modifikasi yang mengandung 2% casein dengan pH 8, diinkubasi pada 120 rpm, selama 7 hari. Diperoleh 5 isolat jamur indigenous alkalofil termotoleran proteolitik dari genus *Aspergillus*, yaitu *A. tamarii* PAM10A, *A. awamori* PAM10D, *A. niger* PAM12A, *A. foetidus* PAM18A, dan *A. flavus* PAM25A dengan aktivitas spesifik ekstrak kasar protease alkalis berturut-turut sebesar 0,1585 U/mg, 0,1715 U/mg, 0,1762 U/mg, 0,1640 U/mg dan 0,1747 U/mg.

Kata Kunci: kapur, jamur, protease, alkalofilik

1. Pendahuluan

Mikroorganisme baik bakteri maupun jamur sebagai organisme heterotrof mempunyai peran di dalam ekosistem sebagai agen biodegradator, menyebabkan mikroorganisme mempunyai peran penting di dalam siklus biogeokimiawi di alam, sebagai penghasil enzim ekstraselular, untuk menguraikan berbagai substrat, yaitu protease, amilase, lipase, selulase, dll. Beberapa jenis enzim mikroorganisme telah digunakan untuk kepentingan industri dan bahkan sudah diproduksi secara industri (Khan, 2013). Protease alkalis merupakan enzim yang paling banyak diproduksi, untuk memenuhi kebutuhan beberapa industri deterjen, selain selulase alkalis, amilase alkalis dan lipase alkalis yang juga ditambahkan ke dalam

deterjen untuk meningkatkan daya bersih (Fujinami & Fujisawa, 2010; Horikoshi, 1999). Saat ini protease telah menjadi salah satu komponen formula deterjen (Rao *et al.* 2003 dalam Mikhailova, 2011). Kebutuhan protease komersial relatif tinggi, mencapai 40% dari seluruh penjualan enzim di seluruh sektor industri, seperti deterjen 'laundry', industri makanan, pengolahan kulit, industri farmasi, pengolahan limbah dan heavy metal recovery (Gupta, *et al.* 1999 dalam Khan, 2013; Tunga, 2003 dan Merheb *et al.*, 2007 dalam Sangmuang, 2010).

Habitat tanah berkapur yang mempunyai pH tinggi dan bersuhu tinggi memberikan peluang untuk mendapatkan mikroorganisme baik bakteri maupun jamur alkalofilik atau alkalotoleran yang mempunyai potensi untuk menghasilkan berbagai enzim alkalofilik

termostabil. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat jamur alkalofil termotoleran indigenous penghasil protease alkalis dari tanah kapur di daerah Sukolilo Barat, Madura dan diharapkan bermanfaat bagi pengembangan enzim protease alkalis bagi industri.

2. Bahan dan Metode

2.1. Sampel sumber isolat

Empat puluh sampel tanah kapur masing-masing sebanyak 100 g diambil dari tepi jalan Suramadu-Sampang pada Km 20, Desa Sukolilo Barat bangkalan, Madura. Sampel tanah berupa serasah, rizosfer tanaman endemik dan tanah pada kedalaman 10 cm.

2.2. Isolasi selektif mikroorganisme.

Isolasi jamur alkalofilik dilakukan secara *pour plate* dan *spread plate* pada medium Czapek's Dox Agar modifikasi dengan penambahan casein 1% dan pH 8 pada suhu 30°C. Kolonijamur yang menunjukkan daerah bening di sekitar koloni, diisolasi ke dalam medium PDA miring dan diinkubasikan pada suhu 30°C., untuk digunakan dalam penelitian selanjutnya.

2.3. Identifikasi dan pemeliharaan isolat

Isolat jamur terpilih diidentifikasi dengan pengamatan makroskopis dan mikromorfologi, pada medium Czapek's Dox Agar (CA), Czapek's Dox Agar yang mengandung 5% Yeast Extract (CYA), Czapek's Dox Agar 20% Sukrosa (CY20S), dan Malt Extract Agar (MEA). Hasil pengamatan digunakan untuk mengidentifikasi isolat kapang menurut Domsch, *et al.* (1980), Samson *et al.* (2010) dan Klich (2002).

Isolat jamur terpilih dipelihara dalam medium agar miring Malt Extract Agar (MEA) dan Potato Dextrose Agar (PDA), disimpan di dalam lemari es untuk digunakan sebagai biakan induk selama penelitian.

2.4. Produksi enzim (Charles *et al.*, 2008)

Isolat jamur ditumbuhkan pada medium miring Czapek Dox Agar selama 5 hari pada suhu 30°C, selanjutnya ke dalam biakan ditambahkan 5 ml larutan NaCl 0.85% dan Tween 80 0.01% untuk mendapatkan konsentrasi spora 10^8 /ml. Sejumlah 1%

suspensi spora diinokulasikan ke dalam 50 ml medium Czapekdox yang mengandung (g/l): Sukrosa, 30; KCl, 0.5; FeSO₄, 0.01; MgSO₄, 0.5; K₂HPO₄, 1.0; NaNO₃, 2.0; casein 1% (pH 8.0). Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar di atas "rotary shaker" dengan kecepatan 120 rpm selama 7 hari. Kultur disaring dengan kertas Whatman no.1, supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar, selanjutnya disentrifugasi pada 10,000 rpm selama 20 min pada suhu 4 °C.

2.5. Aktivitas protease.

Aktivitas protease dilakukan menurut Charles, *et al.* (2008), 1 ml larutan enzim kasar dicampurkan dengan 1 ml larutan casein 2%. Campuran diinkubasi pada 37°C selama 10 menit, selanjutnya disaring dengan kertas saring Whatman no.1. Sebanyak 1 ml filtrat ditambahkan 5 ml Na₂CO₃ 0.4 M dan 1 ml reagen Folin phenol 0.5 N dicampur hingga homogen, diinkubasi kembali pada 37 °C selama 20 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang digunakan untuk membebaskan 1 µmol tyrosine dalam 20 menit pada 37 °C), dinyatakan dengan satuan unit per µmol substrat (U/µmol).

2.6. Kadar protein:

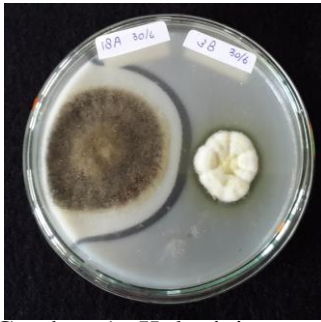
Kadar protein dalam larutan enzim dilakukan dengan menggunakan metoda Lowry dengan menggunakan standar Bovine Serum Albumin.

2.7. Aktifitas spesifik:

Nilai aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim protease ditentukan dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein. Aktivitas spesifik menunjukkan kemurnian enzim, yang dinyatakan dengan jumlah unit aktivitas per miligram protein (Winarno, 1986)

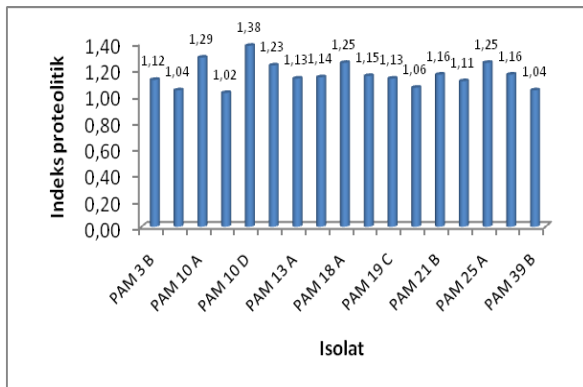
3. Hasil dan Pembahasan

Dari 40 sampel tanah diambil dari lokasi yang ditentukan secara purposive, berhasil diisolasi 17 isolat kapang yang menunjukkan aktivitas proteolitik pada pH 8 dan suhu 40°C. Koloni jamur proteolitik dapat dikenali dengan adanya daerah bening di sekitar koloni yang menunjukkan terjadinya hidrolisis kasein (Gambar 2.).



Gambar 1. Koloni jamur proteolitik alkalofil termotoleran dari tanah kapur pada medium CDA 2% skim milk, pH 8, suhu 40°C inkubasi 5 hari.

Jamur alkalofil dapat diisolasi di daerah Desa Sukolilo Barat, Bangkalan Madura di sekitar jembatan Suramadu. Tanah di daerah ini merupakan tanah urugan yang berkapur, dengan pH berkisar 6,8 – 7,2, pH yang lebih rendah 4,5 - 6 ditemukan pada beberapa lokasi sampling, sedangkan suhu bervariasi berkisar 31-38°C. Aktivitas protease alkalis dari isolat jamur alkalofil termotoleran indigenous diamati dengan indeks proteolitik (Gambar 2). Indeks proteolitik tertinggi, yaitu PAM10A, PAM10D, PAM12A, PAM18A dan PAM 25A.



Gambar 3. Indeks proteolitik isolat jamur alkalofilik termotoleran dari tanah Desa Sukolilo Barat Madura.

Identifikasi isolat jamur alkalofil termotoleran indigenous berdasarkan sifat mikromorfologi dan makroskopis menurut Klich (2002) dan Samson, *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa ke lima isolat merupakan *Aspergillus* seperti terlihat pada Tabel 1. berikut ini.

Tabel 1. Isolat jamur proteolitik alkalofil termotoleran indigenous dari tanah di daerah Sukolilo Barat, Madura

No	Kode isolat	Koloni dan mikromorfologi pada MEA (25°C, 7 hari)	Species
1.	PAM 10 A		<i>Aspergillus tamarii</i>
2	PAM 10 D		<i>Aspergillus awamori</i>
3	PAM 12 A		<i>Aspergillus niger</i>
4	PAM 18 A		<i>Aspergillus foetidus</i>
5	PAM 25 A		<i>Aspergillus flavus</i>

A. tamarii merupakan jamur yang sangat umum di temukan di dalam tanah, terutama di daerah tropis (Klich, 2000). Samson *et al.* (2010) menyebut spesies ini bersifat *panropical*, dapat ditemukan di berbagai bahan dan produk di daerah tropis. Penggunaan dalam bioteknologi adalah sebagai agen pemfermentasi saus tamari, sejenis kecap yang diproduksi di Jepang. Jamur ini dapat menghasilkan berbagai jenis enzim, salah satunya adalah protease alkalis (Anandan, *et al.*, 2007).

A. awamori merupakan jamur yang berwarna hitam anggota dari Section Nigri dikenal juga sebagai *A. niger v. awamori* (Klich, 2000). Koloninya berwarna hitam kecoklatan pada medium MEA, mempunyai metula dan fialid, konidia halus. Jamur ini banyak berhubungan dengan berbagai makanan fermentasi tradisional Asia, juga banyak ditemukan di tanah. *A. awamori* dikenal sebagai jamur penghasil protease (Berka, *et al.*, 1992).

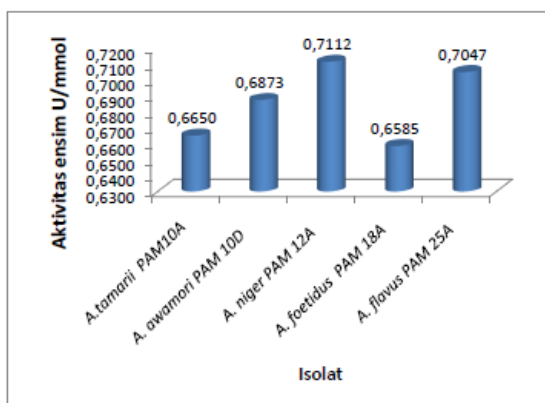
A. foetidus merupakan spesies *Aspergillus* yang umum di temukan di alam. Pada medium MEA koloninya berwarna hitam atau coklat hitam, Mempunyai fialid dan metula, konidia bulat halus. Menurut Raper dan Fennel (1965 dalam Klich 2000) species ini digunakan pada

beberapa proses industri termasuk proses koji dalam pembuatan shochu (kecap Jepang) dan juga untuk produksi ensim.

A. niger merupakan jamur yang penyebarannya sangat luas, hidup pada anggur, kopi, jagung, dan beberapa komoditas makanan. Juga dapat ditemukan dalam tanah di sekitar tanaman. Koloni pada medium Czapeks Dox Yeast Extract Agar (CYA) berwarna hitam-ungu, hitam-coklat sampai hitam. Jamur ini merupakan jamur halotoleran, tumbuh baik pada suhu yang tinggi. Konidianya sangat resisten terhadap radiasi (Samson, *et al.*, 2010). Spesies ini dikenal mempunyai galur yang dapat menghasilkan protease alkalis (Coral *et al.*, 2003; Preetha, 2012)

A. flavus mempunyai koloni berwarna hijau ke kuningan pada medium MEA. Samson *et al.* (2010) menyatakan spesies ini bersifat halotoleran, umum di temukan dan tersebar luas di alam, terutama pada komoditas pangan terutama kacang-kacangan, dan jagung. Jamur ini hidup baik pada suhu tinggi, dan toleran terhadap kondisi aktivitas air yang rendah. *A. flavus* juga diketahui dapat menghasilkan protease alkalis (Chellapandi, 2009; Berka, *et al.*, 1992).

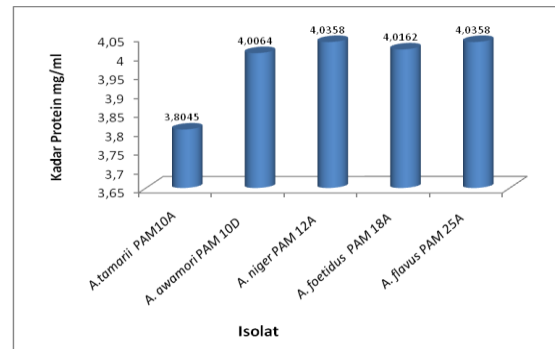
Uji aktivitas ensim dilakukan terhadap ekstrak kasar ensim yang berupa supernatan biakan cair isolat terpilih. Hasil pengukuran aktivitas ensim ekstrak kasar protease menunjukkan bahwa semua isolat dapat menghasilkan protease pada medium dengan pH 8. (Gambar 4.).



Gambar 4. Aktivitas ensim ekstrak kasar protease isolat jamur akalofil termotoleran indigenous dari tanah Sukolilo Barat, Madura

Isolat *A. niger* PAM 12A menunjukkan aktivitas ensim protease tertinggi (Gb. 4.), hal ini sesuai dengan banyak penelitian ensim

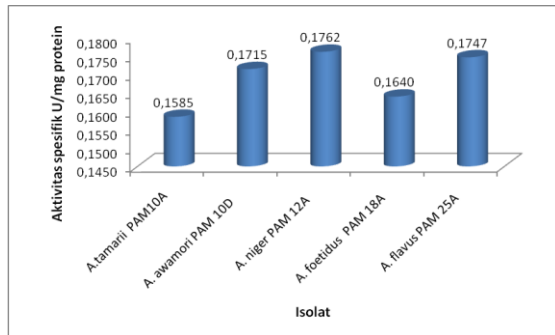
protease alkalis yang menggunakan spesies ini, seperti yang dilakukan oleh Coral *et al.* (2003) dan Preetha (2012). Hasil pengukuran kadar protein ekstrak kasar protease terlihat pada Gambar 5. kadar protein dalam ekstrak kasar ensim protease menunjukkan nilai yang hampir sama antara ke empat isolat, kecuali isolat *A. tamarii* PAM 10A menunjukkan kadar protein yang terendah, hal ini menunjukkan bahwa kecepatan sintesis protein yang paling lambat.



Gambar 5. Kadar protein ekstrak ensim kasar protease isolat jamur akalofil termotoleran indigenous dari tanah Sukolilo Barat, Madura

Kadar protein ekstrak kasar protease diamati untuk menentukan aktivitas spesifik dari ekstrak kasar protease yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Gambar 5. menunjukkan aktivitas spesifik ekstrak kasar ensim dari masing-masing isolat. Aktivitas spesifik tertinggi dihasilkan dari isolat *A. niger* PAM12A, diikuti oleh *A. flavus* PAM25A dan *A. awamori* PAM10D. Ketiga isolat merupakan species-species yang telah dikenal mampu menghasilkan ensim protease alkalis. Isolat-isolat tersebut merupakan jamur indigenous dari tanah kapur di daerah Sukolilo Barat Madura, yang kemungkinan besar mempunyai sifat fisiologis yang berbeda dengan species-species sama yang telah diteliti oleh para peneliti lain. Nilai aktivitas spesifik masih lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh banyak peneliti lain. Devi *et al.* (2008) meneliti aktifitas spesifik protease alkalis hasil pemurnian dari filtrat kultur *Aspergillus niger* yang menghasilkan aktivitas sebesar 4.82 U/mg. Nilai aktivitas spesifik yang rendah dapat disebabkan oleh ekstrak ensim yang diuji masih merupakan ekstrak kasar, aktivitas spesifik ensim akan meningkat apabila dilakukan fraksinasi terlebih dahulu terhadap

ekstrak kasar enzim, fraksinasi enzim akan dilakukan dalam penelitian selanjutnya



Gambar 6. Aktivitas spesifik ekstrak enzim kasar protease isolat jamur alkalofil termotoleran indigenous dari tanah Sukolilo Barat, Madura

4. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan telah berhasil diperoleh 5 isolat jamur proteolitik alkalofilik termotoleran, yang aktif pada pH 8-9 dan suhu 40°C, tiga diantaranya yaitu *A. awamori* PAM 10D, *A. niger* PAM 12A, dan *A. flavus* PAM 25A menunjukkan aktivitas protease alkalis yang lebih tinggi dibandingkan dengan dua isolat yang lain.

Ucapan Terimakasih.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan (Ditlitabmas Ditjen Dikti Kemendikbud) Bantuan Operasional Perguruan Tinggi Negeri (BOPTN) TA 2014, yang telah memberikan biaya penelitian ini. melalui Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA - A) Universitas Diponegoro Nomor DIPA - 023.04.02.189185/2014 tanggal 05 Desember 2013

Daftar Pustaka

Anandan, D., W.N. Marmer & R.L. Dudley. 2007. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 34:339-347.

Charles, P., V. Devanathan, P. Anbu, M.N. Ponnuswamy. P. T. Kalaichelvan & Byung-Ki Hur. 2008. Purification, characterization and crystallization of an

extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J. Bas. Microbiol.* 2008, 48, 347-352.

Chellapandi, P. 2010. Production and Preliminary Characterization of Alkaline Protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. *E-Journal Chem.* <http://www.e-journals.net> 2010, 7(2), 479-482

Coral, G., B. Arian, M.N. Unaldi & H. Guvenmez. 2003. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Ann. Microbiol.*, **53** (4), 491-498

Devi, M.K. A.R. Banu, G.R. Gnanaprabal, B.V. Pradeep & M. Palaniswamy. 2008. Purification of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Ind. J. Sci. Technol.* 1(7):1-6

Domsch, K. H., W. Gams, T. H. Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press. London;

Fujinami, S & Fujisawa M, 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes--past, present and future. *Environ. Technol.* 31(8-9):845-56

Gomes, J. & W. Steiner. 2004. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4) 223-235

Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(4):735-50

Hossain, MD.T., F. Das, L.W. Marzan, M.D. S. Rahman & M.N. Anwari. 2006. Some Properties of Protease of the Fungal Strain *Aspergillus flavus*. *Int. J. Agric. Biol.* 2006/08-2-162-164

Khan, F. 2013. New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innov. Res. Chem.* 1:1 (2013) 1-6

Kladwang, W., A. Bhumirattana & N. Hywel-Jones. 2003. Alkaline-tolerant fungi from Thailand. *Fungal Diversity* 13: 69-83.

Klich, M.A.. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center New Orleans, Louisiana, USA.

Mikhailova, R.V. 2011. Proteolytic enzymes from mycelial fungi 3/2011 :47-61

- Mond, M., G. Togin, L. Rahalson & E. Frenk. 1991. Isolation and Characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* 35:23-28.
- Preetha, P. 2012. Comparative study on production of the alkaline protease enzyme from free and immobilized mycelia of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*, *Discovery life* 1(1), 18-25. www.discovery.org.in/dl.htm
- Pundri, R.K., S. Rana and H. Tyagi. 2012. Studies on Compatibility of Fungal Alkaline Protease with Commercially Available Detergents. *Int. J. Mod. Biochem.*, 1(1): 41-56.
- Sangmuang, S. 2010. Purification and characterization produce by the thermofilik protease fungus *Aspergillus fumigatus* SS0509. Thesis Master of Science. Silpakorn University. Bangkok. Thailand
- Sharma, N. & K. Dee. 2011. Production, purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii*[EF661565.1]. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 2011, 2(7): 1135-1142
- Sivakumar, N., R. Remya & A.b. Saif. 2009. Partial characterization of proteases produced by three fungal isolates from the rhizosphere of wild yam *Dioscorea wallichii*. *Journal of Appl. Biol. Sci.* 3(3):71-75, 2009
- Srinophakun, P. Chutmanop, J, Chuichulcherm, S. & Yusuf Chisti, Y. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates *J Chem Technol Biotechnol* 83:1012–1018
- Solekhah. 2012. Eksplorasi dan uji ensimatis kapang *Aspergillus* termotolen dari tanah desa Sukolilo Barat Kecamatan Labang Kabupaten Bangkalan Madura. Skripsi. Jurusan Biologi Universitas Diponegoro.
- Ulunkanli, Z. & M. Diurak. 2002. Alkalophilic Micro-organisms and Habitats *Turk. J. Biol.* 26 (2002) 181-191