

Pengaruh Kadar Nitrogen dalam Media pada Pembuatan Protease Menggunakan *Bacillus megaterium* DSM 319

TRISMILAH¹, SUMARYANTO^{2*}

¹Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri BPP Teknologi

²Pusat Pengkajian Kebijakan Inovasi Teknologi BPP Teknologi,

Gedung II, Lt. 15 Jl. MH. Thamrin No.8, Jakarta, 10340

Lab Teknologi Bioindustri, Gd.411, Lt.II, PUSPIPTEK, Serpong, 15314

Diterima 5 November 2004, Disetujui 13 Januari 2005

Abstract: The media components and fermentation conditions play an important role for the result of fermentation processes, for instance nitrogen is one of the element which is influence for the growth of microorganism. Therefore it is needed the available media formulation for the optimal growth of microorganism with high productivity. It was shown in this protease production experiment by using *Bacillus megaterium* DSM 319 with media of Geolitti Cantoni (G&C) with modified of urea as source of nitrogen. The variation of carbon and nitrogen ratio which are used in this process are 3 : 0.8, 3 : 1.5, 3 : 2, 3 : 2.5. Fermentation conditions were adjusted : temperature at 37°C, pH 7.5 and agitation of 250 rpm. The result of this process indicated that carbon and nitrogen ratio of 3 : 2 giving highest enzyme activity at 18 hours. The other results such are specific activity 6.552 Unit / protein mg, specific growth rate (μ_{max} /h) 0.074, duplication time (t_d jam) 9.367, coefficient convert (Yx/s) 0.23.

Key words: nitrogen, protease, specific activity

PENDAHULUAN

Enzim merupakan golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai biokatalisator pada reaksi-reaksi biokimia⁽¹⁾. Salah satu enzim yang berperan di dalam industri adalah enzim protease karena enzim ini banyak digunakan baik untuk pangan maupun non pangan^(2,3).

Pada industri pangan protease digunakan dalam industri bir, alkohol, roti, biskuit dan industri kecap. Selain itu juga protease juga digunakan untuk mengempukkan daging, menghidrolisis protein pada ikan; sedangkan pada industri non pangan, protease digunakan dalam industri kulit, tekstil dan bahan pembersih/deterjen.

Pada industri biskuit dan roti, penambahan enzim protease digunakan untuk mengembangkan adonan sehingga waktu yang dibutuhkan pada pembuatan biskuit dan roti lebih cepat. Penambahan protease pada industri alkohol ditujukan untuk menghidrolisis protein yang menyelubungi pati, sehingga pati lebih mudah dipecah oleh khamir menjadi alkohol.

Pada industri bir, protease ditambahkan untuk mencegah kekeruhan apabila bir didinginkan, karena protein yang terdapat dalam bir akan terhidrolisis sehingga tidak terjadi reaksi antara protein dan tanin⁽⁴⁾.

Enzim protease dalam industri kulit digunakan untuk melepaskan bulu-bulu dan menghidrolisis protein, sehingga dapat melunakkan kulit, sedangkan dalam industri detergen akan menghilangkan noda yang mengandung protein⁽⁵⁾. Bakteri dari genus *Bacillus* yang dinyatakan paling berpotensi untuk dikembangkan dalam industri penghasil protease 2) yaitu *Bacillus megaterium*, *Bacillus amylo-liquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus firmus*. Sedangkan dari kelompok kapang: *Aspergillus niger*, *Aspergillus soyae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*⁽⁶⁾.

Dalam penelitian ini digunakan *Bacillus megaterium* DSM 319 sebagai penghasil enzim protease. Bakteri *Bacillus megaterium* DSM 319 sebagai galur untuk industri mempunyai beberapa keistimewaan diantaranya adalah mempunyai sifat yang bagus secara genetis dan fisiologis, dalam substrat yang murah memberikan hasil yang tinggi⁽⁷⁾. Keberhasilan dalam memproduksi enzim dengan mikroba, akan tergantung pada kultur yang digunakan,

* Penulis untuk korespondensi, Hp. 081380110999,
email: sumary13@hotmail.com

komponen medium dan kondisi lingkungan fermentasi⁽⁸⁾.

Media merupakan salah satu faktor penting dalam fermentasi, karena mikroba dapat hidup dalam media tersebut, tumbuh serta berkembang biak dan dapat mensintesis produk. Oleh karena itu media harus dipersiapkan dengan kandungan bahan-bahan yang memenuhi syarat dan cukup untuk berkembang biak dan cukup pula untuk diubah menjadi produk.

Media dapat dibedakan menjadi media sintetik dan media kasar. Media sintetik merupakan media yang komposisi konstituen senyawanya diketahui. Media kasar adalah media yang belum diketahui secara pasti komposisinya. Bila terdapat kekurangan atau tidak terdapat nutrien yang dibutuhkan, maka perlu ditambahkan dari luar. Dalam penelitian ini digunakan media sintetik yaitu komposisi konstituen senyawanya diketahui untuk mendapatkan formula. Sehingga apabila fermentasi menggunakan media kasar kebutuhan karbon dan nitrogen bisa diperkirakan dari formula yang ada. Dari penelitian ini diharapkan untuk mendapatkan formulasi media fermentasi yang tepat sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme dan diharapkan akan berpengaruh pada produktivitas yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus megaterium* DSM 319 yang diperoleh dari Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri, PUSPITEK, Serpong, Jawa Barat.

METODE. Untuk pembuatan protease ada beberapa tahapan yaitu pemurnian bakteri menggunakan skim mik agar, di inkubasi selama 24-48 jam, pada suhu 37°C, kemudian regenerasi bakteri di dalam media nutrien agar miring di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya pembuatan starter yaitu 1 ose *Bacillus megaterium* DSM 319 dari galur agar lalu diinokulasikan ke dalam Luria Bertani (LB) cair 10 ml, inkubasi di inkubator kocok selama 24 jam pada suhu 37°C dan dengan agitasi 225 rpm kemudian inokulum tersebut diinokulasi ke media fermentasi sebanyak 90 ml, inkubasi kembali di inkubator pada suhu 37°C selama 18 jam dengan agitasi 225 rpm lalu diinokulasi masing-masing 2 ml ke erlenmeyer yang berisi media fermentasi. Media fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan memvariasikan perbandingan karbon dan nitrogen yang mengacu pada media Giolitti dan Contoni (G&C) dimodifikasi yaitu menggunakan sumber nitrogen urea yang divariasikan. Variasi perbandingan karbon dan nitrogen

yaitu 3 : 0,8; 3 : 1,5; 3 : 2; dan 3 : 2,5. Produksi enzim protease dengan menggunakan inkubator kocok dan dilakukan pengamatan pada jam ke 0,4; 8; 12; 14; 16; 18; 20; dan 24 terhadap jumlah sel bakteri menggunakan alat Haemasitometer, berat kering sel, analisis N dengan larutan natrium nitroprusid diukur pada panjang gelombang 630 nm, gula reduksi metode Somogy's, pengujian aktivitas enzim protease berdasarkan modifikasi n-Amano yaitu berdasarkan besarnya kemampuan enzim dalam menggunakan substrat kasein, hasil hidrolisa kasein oleh enzim tersebut adalah tirosin yang larut dalam *Tri Chlor Acetic Acid* (TCA) dan dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 660 nm, analisis kandungan protein terlarut dengan metode Lowry. Sebelum melakukan analisis terlebih dahulu dibuat kurva standar protein menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan dalam memproduksi enzim dengan mikroba tergantung dari kultur yang digunakan, komponen medium dan kondisi lingkungan fermentasi⁽⁹⁾. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba adalah suhu, pH, komposisi media fermentasi, agitasi dan aerasi. Bila salah satu faktor tersebut tidak sesuai maka akan menyebabkan mikroba tidak dapat tumbuh secara optimum sehingga produksi enzim juga akan terhambat.

Pada umumnya mikroba memerlukan unsur karbon dan nitrogen dalam pertumbuhannya, unsur karbon dapat meningkatkan energi dan biosintesis, sehingga persediaan sumber karbon yang cukup perlu untuk produksi fermentasi, sedangkan unsur nitrogen untuk mempercepat pertumbuhan sel dalam fermentasi. Pemilihan media fermentasi merupakan salah satu faktor yang penting dalam memproduksi enzim dengan bakteri. Analisa N dilakukan pada C/N = 3/0,8; 3/1,5; 3/2; 3/2,5 untuk mengetahui kandungan Nitrogen yang cukup sehingga didapat aktivitas enzim tertinggi dan pertumbuhan bakteri dapat optimal.

Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa analisis N (mg/ml) hasil penelitian dengan variasi kadar N (kadar glukosa tetap) tidak berbeda nyata. Kandungan nitrogen tertinggi didapat pada perbandingan C/N = 3/2 pada jam ke-20 yaitu sebesar 7,7252 mg/ml, hal ini kemungkinan disebabkan karena perbandingan sumber karbon dan nitrogen yang dipergunakan untuk pertumbuhan bakteri cukup tersedia sehingga bakteri dapat tumbuh secara optimal sedangkan kandungan nitrogen terendah didapat pada perbandingan C/N = 3/0,8 pada jam ke-20 yaitu sebesar 6,4932 mg/ml.

Pada akhir fermentasi kadar nitrogen tidak turun tajam hal ini disebabkan oleh nitrogen yang berasal dari sel yang sudah lisis ditambah nitrogen dari senyawa lain. Rendemen nitrogen tertinggi diperoleh pada perbandingan glukosa dan nitrogen 3 : 2,5 yaitu 161%, sedangkan perbandingan glukosa dan nitrogen 3 : 2 adalah 138%.

Namun pada perbandingan glukosa dan nitrogen 3 : 2, hasil dari pengamatan untuk jumlah sel, gula reduksi dan berat kering sel diperoleh laju pertumbuhan spesifik terkecil yaitu 0,074 sedangkan waktu penggandaan dan koefisien konversinya terbesar masing – masing 9,367 dan 0,23 lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 1.

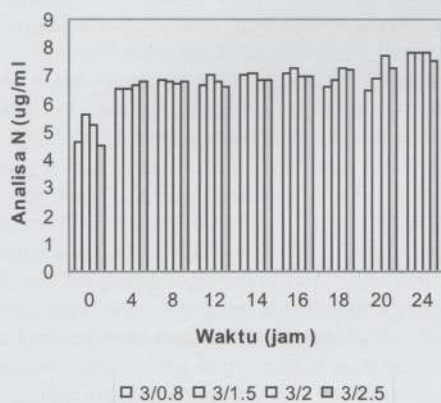
Untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas tinggi diperlukan kondisi pertumbuhan yang sesuai untuk bakteri. Pada setiap fermentasi memerlukan media tertentu karena bila tidak sesuai akan mempengaruhi jenis produk yang dihasilkan dari mikroba tersebut. Pada gambar 2 terlihat aktivitas enzim protease

spesifik tertinggi pada C/N = 3/2 dan aktivitas enzim protease spesifik terendah pada C/N = 3/0,8. Pada C/N = 3/2 aktivitas enzim protease spesifik tertinggi dicapai pada jam ke-18 yaitu sebesar 6,5521 unit/mg protein. Sementara itu pada C/N = 3/0,8 didapat aktivitas enzim protease spesifik sebesar = 5,2601 unit/mg protein, pada C/N = 3/1,5 didapat aktivitas enzim protease spesifik 6,3115 unit/mg protein dan pada C/N = 3/2,5 didapat aktivitas enzim protease spesifik 6,1170 unit/mg protein.

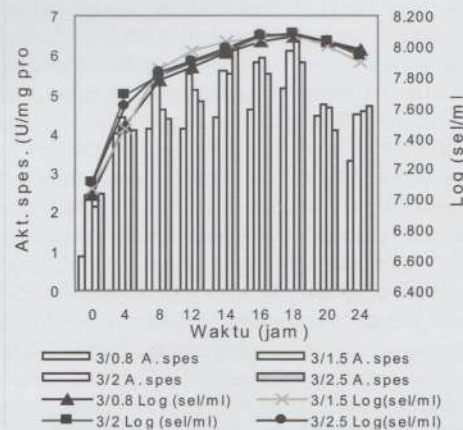
Aktivitas enzim protease spesifik tertinggi terlihat pada C/N = 3/2. Hal ini mungkin disebabkan oleh komposisi dari media fermentasi yang tepat serta faktor-faktor lain yang mendukung sehingga bakteri dapat tumbuh secara optimum. Sedangkan pada C/N = 3/0,8 mempunyai aktivitas enzim protease spesifik terendah mungkin disebabkan oleh komposisi antara karbon dan nitrogennya kurang mencukupi sehingga pertumbuhan bakteri tidak berlebihan.

Tabel 1. Laju pertumbuhan spesifik (μ_{max} /jam), waktu penggandaan (t_g jam), koefisien konversi (Yx/s) dari *B. megaterium* DSM 319 menggunakan media G&C dimodifikasi pada suhu 37°C, pH awal 7,5, agitasi 225 rpm

Karbon : Nitrogen	3 : 0,8	3 : 1,5	3 : 2	3 : 2,5
μ_{max} (jam ⁻¹)	0,09	0,081	0,074	0,078
t_g (jam)	7,702	8,557	9,367	8,887
Yx/s (gmas.sel/gluk)	0,118	0,136	0,23	0,151



Gambar 1. Analisis nitrogen dari fermentasi pembuatan Protease dengan *B. megaterium* DSM 319 menggunakan media G&C dimodifikasi pada suhu 37°C, pH awal 7,5, agitasi 225 rpm.



Gambar 2. Aktivitas enzim Unit/mg protein dan Log jumlah sel/ml dari fermentasi pembuatan Protease dari *B. megaterium* DSM 319 menggunakan media G&C perbandingan glukosa dan nitrogen bervariasi (3/0,8; 3/1,5; 3/2; 3/2,5) pada suhu 37°C, pH awal 7,5, agitasi 225 rpm.

SIMPULAN

Aktivitas enzim protease dipengaruhi oleh kadar nitrogen, yaitu aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh perbandingan C/N = 3 : 2.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yusanti H. Produksi protease dari *Bacillus megaterium* DSM 319 dan *Bacillus megaterium* 961 dengan media limbah tahu cair [skripsi]. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 1998.hal.30-5.
2. Aunstrup K. Production, isolation and economics of extracelluler enzymes. Volume II. New York: Academic Press; 1979.p.28-57.
3. Ward OP. Protease in microbial enzymes and biotechnology. New York: Publisher. LTD; 1983.p. 251-83,285-303.
4. Suhartono MT. Enzim dan bioteknologi. Bogor : PAU Bioteknologi IPB; 1989.hal.262-72.
5. Rahman A. Teknologi fermentasi industrial II. Bogor: Kerja sama dengan PAU Pangan dan Gizi IPB; 1992.hal.23-8.
6. Waltam RD dan Sumaryanto. Industrial enzyme and biotechnology. Proceeding, Jakarta; 1997. hal. 184-9.
7. Paturau MJ. By product of the cane sugar industry : an introduction utilization. New York: Elsevier publishing company; 1969.p.153-133.
8. Wiyono D, Haryono B, Sarjono. Kinetika mikroba dan fermentasi. Yogyakarta : Jurusan Pengolahan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian UGM; 1983.hal.5.