

Karakterisasi Protease asal Kapang Endofit *Fusarium* sp. JE-DP4a

Characterization of Protease from Endophytic Fungi *Fusarium* sp. JE-DP4a

Aerma Hastuty^{*}), Irma Herawati, Megga Ratnasari Pikoli

Pusat Riset Biologi-BRIN, Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta-Bogor, KM. 46, 16911

*E-mail: mima_hdy@yahoo.com

ABSTRACT

Protease is a catalytic enzyme that catalyzes a proteolysis process and breaks down a protein into smaller polypeptides or amino acids. Endophytic fungi can produce bioactive compounds, one of which is protease enzymes. The papaya leaf endophytic fungi used in this study was *Fusarium* sp. strain JE-DP4a. This study was conducted to determine the characterization of protease from endophytic fungi *Fusarium* sp. strain JE-DP4a with variations in incubation temperature of 30, 37, and 44°C and pH variation of 5.5-8. Measurement of protease enzyme activity using a spectrophotometer UV-Vis at 280 nm. Based on the research results, the highest protease activity produced at a temperature of 44°C is 53.78 U/mL, and specific activity is 17.31 U/mg protein. Protease activity at pH 7 shows the highest was 46.72 U/mL. Thus it is ably concluded that the protease produced by *Fusarium* sp. strain JE-DP4a belongs to the neutral protease group.

Keywords: Protease, *Fusarium* sp. strain JE-DP4a, Endophyte, Fungi.

PENDAHULUAN

Protease (E.C. 3.4.11-24) merupakan enzim katalitik yang memiliki peranan dalam menghidrolisis ikatan peptida protein kemudian memecahnya menjadi polipeptida atau asam amino bebas (Alnahdi 2012, Souza *et al.* 2017). Protease, merupakan salah satu dari tiga kelompok enzim industri terbesar, menyumbang sekitar 60% dari penjualan enzim di seluruh dunia (Rupali 2015). Keberadaan protease dapat ditemukan pada tanaman, hewan dan mikroba yang meliputi bakteri, kapang, alga dan virus (Mahajan & Badgular 2010). Namun pada dekade ini, pencarian dan pemanfaatan protease banyak dilakukan dengan memanfaatkan mikroba salah satunya adalah kapang endofit. Protease yang dihasilkan dari kapang, banyak digunakan dalam aplikasi industri pembuatan keju, penjernihan bir, pengubah protein makanan dan hidrolisat protein.

Pemanfaatan mikroba endofit, khususnya kapang endofit, sudah mulai dilakukan dalam produksi protease dikarenakan mikroba dapat tumbuh dengan cepat dan membutuhkan ruang yang sangat terbatas untuk pertumbuhannya (Sharma *et al.* 2015), serta biaya produksi yang rendah dibandingkan dengan enzim dari tumbuhan dan hewan (Zaferanloo *et al.* 2014). Meskipun demikian, beberapa tanaman yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan protease masih digunakan.

Tanaman *Carica papaya* L., memiliki potensi untuk menghasilkan protease diantaranya yaitu papain yang berasal dari getah

pepaya. Selain itu, getah pepaya banyak mengandung sistein endopeptidase, glisil endopeptidase, sistein proteinase, inhibitor serin protease, glutaminyl cyclase caricain, dan chymopapain (Azarkan *et al.* 2006, Huet *et al.* 2006). Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari karakterisasi ekstrak kasar protease yang dihasilkan oleh kapang endofit *Fusarium* sp. JE-DP4a yang diisolasi dari daun pepaya. Pemilihan kapang endofit dalam penelitian ini dikarenakan penelitian tentang kapang endofit asal tanaman pepaya yang memiliki aktivitas protease belum banyak dilakukan.

METODE

Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Fusarium* sp. JE-DP4a merupakan kapang endofit yang diisolasi dari daun tanaman pepaya (*Carica papaya* L.).

Isolasi Kapang Endofit

Isolasi kapang endofit dilakukan menggunakan media *Malt Extract Agar* (MEA) dengan komposisi (g/L): 30 g ekstrak malt, 5 g pepton dan 15 g agar. Daun pepaya terlebih dahulu dicuci bersih menggunakan air mengalir, kemudian dipotong-potong dengan ukuran 5 x 5 cm. Potongan bagian daun disterilisasi menggunakan metode *surface sterilization* mengacu pada Hashim *et al.* (2021) dengan sedikit modifikasi. Potongan daun dimasukkan kedalam larutan chlorox 3%, selama 1 menit, kemudian dipindahkan kedalam larutan alkohol 70%, selama 5 menit, kemudian dibilas menggunakan akuades steril selama 5 menit. Potongan daun yang telah disterilisasi, dikeringkan menggunakan kertas tisu steril, kemudian dipotong-

potong dengan ukuran 1×1 cm menggunakan gunting atau *scapel* steril, kemudian diletakkan diatas permukaan media MEA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 28 °C.

Pengujian Aktivitas Protease secara Kualitatif

Pengujian dilakukan dengan menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA) dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Adapun komposisi media SMA (g/L) yaitu 28 g susu skim, 5 g *tryptone*, 2,5 g *yeast extract*, 1 g dekstrosa, 15 g agar. Keberadaan aktivitas proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona jernih pada sekitar koloni kapang.

Produksi Enzim Protease

Produksi protease dilakukan menggunakan media Czapek-*dox* + kasein dengan komposisi (g/L) 30 g sukrosa, 1 g K₂HPO₄, 0,01 g FeSO₄.7H₂O, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 0,5 g KCl, 3 g NaNO₃, dan 10 g kasein. Isolat kapang yang telah diisolasi di media MEA, diinkubasi selama 7 hari, kemudian bagian *hyphal tip* dicetak bentuk bulatan menggunakan *cork borer* atau sedotan steril. Sebanyak 20 bulatan diinokulasikan dalam 200 mL media produksi dan diinkubasi selama 7 hari dalam *shaker incubator* (30°C, 120 rpm). Ekstrak enzim dilakukan melalui pemisahan antara filtrat dan supernatan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim (Yusriah & Kuswytasari, 2013 dengan modifikasi).

Pengujian Aktivitas Protease secara Kuantitatif

Pengukuran aktivitas protease dilakukan selama 7 hari dan mengacu pada metode Chow & Peticolas (1948) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 0,5 mL bufer fosfat 0,2 M, pH 7,0 ditambahkan dalam 2 mL substrat kasein 1% (b/v), kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan ekstrak kasar enzim sebanyak 0,5 mL dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya reaksi dihentikan dengan penambahan 2,5 mL asam trikloroasetat (TCA) 5% dan diinkubasi selama 20 menit dalam *ice bath* agar enzim tidak terdenaturasi, kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Aktivitas enzim ditentukan dengan menentukan kadar tirosin menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ280 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghidrolisis kasein untuk menghasilkan 1 μg tirosin tiap menit (Huang *et al.* 2006). Aktivitas protease dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Protease} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\mu\text{mol Tyrosin} \times (A)}{(B) \times (C) \times (D)} \quad (1)$$

A= Total volume (mL) uji

B= Waktu inkubasi (menit) sebagai definisi per Unit

C= Volume enzim yang digunakan (mL)

D= Volume kuvet (mL)

Aktivitas spesifik protease yang dihasilkan oleh *Fusarium* sp. JE-DP4a dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Spesifik} \left(\frac{U}{mg \text{ Protein}} \right) = \frac{(A)}{(B)} \quad (2)$$

A= Unit aktivitas protease (U/mL)

B= Kadar protein (mg/mL)

Optimasi pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease

Metode pengukuran mengacu pada (Chow & Peticolas 1948) yang telah dimodifikasi. Optimasi pH terhadap aktivitas protease dilakukan pada variasi pH 5,5 – 8. Sementara itu, optimasi suhu dilakukan dengan variasi suhu 30, 37 dan 44°C. Pengukuran aktivitas dilakukan selama 7 hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Aktivitas Protease secara Kualitatif

Berdasarkan hasil penelitian mengenai pengujian aktivitas protease secara kualitatif, diketahui bahwa *Fusarium* sp. JE-DP4a memiliki aktivitas proteolitik (Gambar 1).



Gambar 1. Pengujian aktivitas protease *Fusarium* sp JE-DP4a secara kualitatif.

Skim milk yang digunakan sebagai substrat dalam pengujian aktivitas protease memiliki kandungan kasein yang berfungsi sebagai substrat dalam kerja aktivitas protease sehingga kasein akan terhidrolisis menjadi senyawa peptida dan asam amino yang sifatnya larut dalam medium.

Protein kasein terdiri dari fosfoprotein yang dapat berikatan dengan kalsium dan membentuk garam kalsium kalseinat sehingga dapat menghasilkan warna putih (Choirunissa *et al.* 2017). Jika kasein terhidrolisis oleh protease, maka warna putih yang terbentuk akan menghilang dan menyebabkan warna medium menjadi bening, yang menyebabkan terbentuknya zona jernih di sekitar koloni.

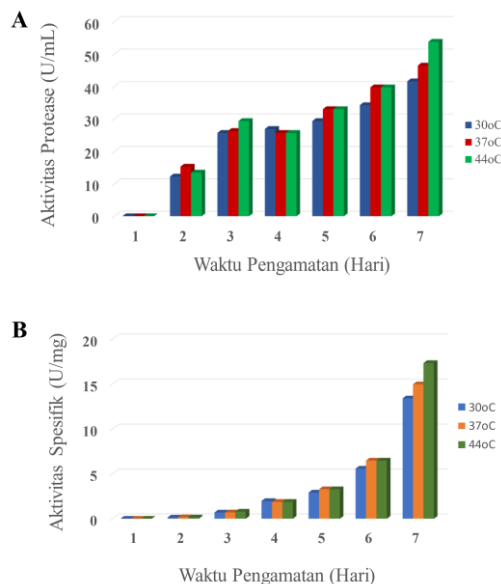
Pengujian Aktivitas Protease secara Kualitatif

Protease atau dikenal juga sebagai peptidase atau proteinase merupakan enzim proteolitik. Aktivitas protease dari *Fusarium* sp. JE-DP4a memperlihatkan aktivitas tertinggi berada pada hari ke-7 yaitu sebesar 27,867 U/mL (Gambar 2). Aktivitas protease terjadi dikarenakan

adanya proses hidrolisis kasein oleh enzim proteolitik menjadi peptida dan asam amino.



Gambar 2. Aktivitas protease *Fusarium* sp. JE-DP4a



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease (A) dan aktivitas spesifik (B) dari *Fusarium* sp. JE-DP4a

Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Protease

Pengujian aktivitas protease pada berbagai suhu dilakukan untuk mengetahui suhu optimum aktivitas protease dari *Fusarium* sp. JE-DP4a. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa aktivitas protease tertinggi dapat dihasilkan pada suhu 44°C yaitu sebesar 53,78 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 17,31 U/mg protein (Gambar 3).

Aktivitas enzim tersebut dapat dikatakan cukup tinggi bila dibandingkan dengan kapang endofit *Penicillium* sp. yang memiliki aktivitas protease sebesar 2,426 U/mL (Yusriah & Kuswytasari 2013). Namun aktivitas protease dari *Fusarium* sp JE-DP4a lebih rendah bila dibandingkan dengan *Alternaria alternata* EL-

17 yang diisolasi dari tanaman *Cupressus tulurosa* D.Don. yang memiliki aktivitas sekitar 56 U/mL pada suhu optimum 27°C (Agrawal *et al.* 2016).

Sementara itu, pada suhu 30°C dan 37°C, aktivitas protease yang dihasilkan yaitu sebesar 41,56 U/mL dan 46,44 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 13,38 U/mg protein dan 14,95 U/mg protein.

Aktivitas spesifik protease ini memiliki nilai lebih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas spesifik dari *A. alternata* yang diisolasi dari tanaman *Eremophila longifolia* dengan aktivitas spesifik protease sebesar 69,86 BAEE (N-a-benzoyl arginine ethyl ester) U/mg pada suhu optimum 37°C (Zaferanloo *et al.* 2014).

Suhu merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kerja enzim dan merupakan suatu fenomena yang kompleks. Aktivitas protease yang berlangsung pada suhu rendah dapat memperlambat kerja enzim, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu optimum dapat menyebabkan denaturasi enzim sehingga akan terjadi penurunan aktivitas enzim. Menurut (Noviyanti *et al.* 2012), tinggi rendahnya aktivitas protease sangat dipengaruhi oleh tinggi rendahnya suhu. Hal ini disebabkan karena adanya energi aktivasi yang dibutuhkan untuk meningkatkan sistem kompleks aktif suatu molekul enzim maupun molekul substrat.

Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Protease

Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh pH karena ion hidrogen dapat mempengaruhi aktivitas dan struktur dimensi enzim, sehingga dapat meningkatkan atau menurunkan kecepatan aktivitas suatu enzim. (Yusriah & Kuswytasari 2013), menyatakan bahwa setiap enzim memiliki pH optimum yang dapat mempengaruhi struktur tiga dimensi menjadi lebih kondusif dalam mengikat substrat.

Berdasarkan hasil penelitian, aktivitas protease tertinggi berlangsung pada pH 7 yaitu sebesar 46,72 U/mL (Gambar 4), sehingga dapat dikatakan bahwa protease yang dihasilkan oleh *Fusarium* sp. JE-DP4a merupakan protease kelompok netral. Pendapat ini didukung oleh pendapat dari Nascimento & Martin (2004), yang melaporkan bahwa pH optimum protease berada pada pH 7-8,5 (netral). Penurunan aktivitas protease dari *Fusarium* sp. JE-DP4a dapat disebabkan karena adanya perubahan ion substrat dan enzim. Pendapat ini didukung oleh pendapat Nirmala *et al.* (2021), yang menyatakan bahwa perubahan ion substrat dan enzim dapat terjadi pada residu asam amino

yang berfungsi dalam mempertahankan struktur enzim aktif yang terdapat pada struktur tersier dan kuaterner.



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease dari *Fusarium* sp. JE-DP4a

Berdasarkan kelompoknya, protease dibedakan dalam tiga kelompok yaitu protease asam, netral dan basa atau alkali. Peneliti lain melaporkan bahwa protease alkali berada pada kisaran pH 9-13 dan protease asam berada pada kisaran 2-6 (Chandrasekaran *et al.* 2015, Souza *et al.* 2015).

Zaferanloo *et al.* (2014), melaporkan dalam penelitiannya bahwa enzim protease kapang endofit aktif dalam kisaran pH yang luas, yaitu pH 3-9. Agrawal *et al.* (2016), melaporkan bahwa kapang endofit *Alternaria alternata* mampu menghasilkan enzim protease dalam berbagai kisaran pH yaitu pH 3-12. Selain itu, *Aspergillus flavus* memiliki aktivitas protease tertinggi pada pH 4 (Muthulakshmi *et al.* 2011), *Aspergillus niger* PAM18A pada pH 9 (Ramadhani *et al.* 2015), *Penicillium chrysogenum* dan *Aspergillus niger* pada pH 9 (Sonia & Gupta 2015).

KESIMPULAN

Fusarium sp. JE-DP4a memiliki aktivitas protease tertinggi pada suhu 44°C yang merupakan suhu optimum yaitu sebesar 53,78 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 17,31 U/mg protein dan pH optimum 7 dengan aktivitas protease sebesar 46,72 U/mL, sehingga dapat disimpulkan bahwa protease yang dihasilkan oleh *Fusarium* sp. JE-DP4a tergolong kedalam kelompok protease netral.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal PK, Rajput K & Chanyal S. 2016. Optimization of Protease Production by Endophytic Fungus, *Alternaria alternata* Isolate from gymnosperm tree-*Cupressus torulosa* D.Don.. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **5**(7): 1034-1054.
- Alnahdi HS. 2012. Isolation and Screening of Extracellular Proteases Produced by New Isolated *Bacillus* sp.. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **2**(9): 071-074.
- Azarkan M, Dibiani R, Goormaghtigh E, Raussens V, & Bayens-Volant D. 2006. The Papaya Kunitz-Type Trypsin Inhibitor is A Highly Stable β -sheet glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomic*. **1764**: 1036-1072.
- Chandrasekaran S, Kumaresan SSP & Manavalan M. 2015. Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvavur District Tamilnadu. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. **3**(06): 066-069.
- Choirunissa HN, Sari RY, Hastuti US & Witjoro A. 2017. Identifikasi dan Uji Kemampuan Hidrolisis pada Bakteri Amilolitik dan Proteolitik yang Diisolasi dari Wadi, Makanan Khas Kalimantan Tengah. *Jurnal Bionature*. **18**(2): 99-109.
- Chow BF & Peticolas M-A. 1948. A rapid Method for The Determination of Proteolytic Activities of Enzyme Preparations. *Journal General of Physic*, **32**(1): 17-24.
- Hashim SN, Ghazali SZ, Sidik NJ, Chia-Chay T & Saleh A. 2021. Surface Sterilization Method for Reducing Contamination of *Clinacanthus Nutans* Nodal Explants Intended for in-vitro culture. *E3S Web of Conferences*. **306**: 01004.
- Huang G, Tiejing Y, Po H & Jiaying J. 2006. Purification and Characterization of A Protease From Thermophilic *Bacillus* strain HS08. *African Journal of Biotechnology*. **5**(24): 2433-2438.
- Huet J, Looze Y, Bartik K, Raussens V, Wintjens R & Boussard P. 2006. Structural Characterization of The Papaya Cysteine Proteinases at Low pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **341**: 620-626.
- Mahajan RT & Badgujar SB. 2010. Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review Purification of NGAL View Project Wound Healing Agents of Plant Origin. *Journal of Pharmacy Research*. **3**(9): 2048-2068.
- Muthulakshmi C, Gomathi D, Kumar DG, Ravikumar G, Kalaiselvi M & Uma C. 2011. Production, Purification and

- Characterization of Protease by *Aspergillus Flavus* Under Solid State Fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*. **4**(3): 137-148.
- Nascimento AWC & Martins MLL. 2004. Production and Properties of An Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**: 91-96.
- Nirmala D, Yudha P, & Cahyanto D. 2021. The Effect Of Ph And Incubation Time on Rude Protease Enzymes Activity of *Bacillus Mycooides* from Anchovy Isolates (*Stolephorus* sp.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. **679**(1): 012075.
- Noviyanti T, Ardiningsih P & Rahmalia W. 2012. Pengaruh Temperature Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. **1**(1): 31-34.
- Ramadhani P, Rukmini MGI & Pujiyanto S. 2015. Produksi Enzim Protease dari *Aspergillus niger* PAM18A dengan variasi pH dan Waktu Inkubasi. *Jurnal Biologi*. **4**(2): 25-34.
- Rupali D. 2015. Screening and Isolation of Protease Producing Bacteria From Soil Collected from Different Areas of Burhanpur Region (MP) India. *International Journal Current Microbiology and Apply Science*. **4**(8): 597-606.
- Sharma AK, Sharma V, Saxena J, Yadav B, Alam A & Prakash A. 2015. Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Bacterial And Fungal Isolates of Soil. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*. **3**(9): 334-340.
- Sonia S & Gupta S. 2015. Optimization of Protease Production from Fungi Isolated From Soil. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. **6**(3): 149-153.
- Souza PM, de Assis Bittencourt ML, Caprara C C, de Freitas M, de Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Filho EXF, Junior AP & Magalhães PO. 2015. A Biotechnology Perspective of Fungal Proteases. In *Brazilian Journal of Microbiology*. **46**(2): 337-346.
- Souza PM, Werneck G, Aliakbarian B, Siqueira F, Filho EXF, Perego P, Converti A, Magalhães PO & Junior AP. 2017. Production, Purification and Characterization of An Aspartic Protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*. **109**: 1103-1110.
- Yusriah & Kuswytasari ND. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. **2**(1): 48-50.
- Zaferanloo B, Quang TD, Daumoo S, Ghorbani, MM, Mahon PJ & Palombo EA. 2014. Optimization of Protease Production by Endophytic Fungus, *Alternaria Alternata*, Isolated from an Australian native plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **30**(6): 1755-1762.

