

Uji Aktivitas Protease Empat Isolat *Trichoderma* spp. yang Berasal dari Tanah Perakaran

Fitria Dewi Sulistiyono^{1,*}, Loekas Soesanto², Nuniek Ina Ratnaningtyas³

¹Program Studi Farmasi, Universitas Pakuan, Bogor

²Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

³Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

*Penulis korespondensi: fitria.sulistiyono@unpak.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v9.n3.36774>

Abstrak: Perkembangan industri protease telah pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Protease dapat diperoleh dari semua makhluk hidup, namun saat ini pemakai enzim banyak yang beralih pada enzim mikrobia. Keunggulan enzim microbial adalah produksi tinggi, kemudahan dan efisiensi dalam pengaturan pertumbuhan, limbah pertanian dapat dimanfaatkan sebagai sumber substrat. Salah satu mikroba adalah *Trichoderma* spp. *Trichoderma* sp dapat berasal dari tanah perakaran tanaman (rhizosfer). Jenis tanah perakaran diantaranya adalah jahe, nanas, pisang dan bawang merah. Keempat tanaman ini merupakan tanaman yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat. Tujuan penelitian ini adalah menentukan jumlah protease yang terdapat pada *Trichoderma* spp. Metode penelitian dilakukan dengan kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan dengan mengukur zona bening yang terdapat pada medium proteolitik agar sedangkan uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan larutan pembanding tirosin. Hasil menunjukkan bahwa jumlah protease yang dihasilkan oleh *Trichoderma* spp tidak berbeda nyata yaitu isolat jahe adalah 12,95 U/mL, isolat nanas sebesar 11,86 U/mL, isolat pisang sebesar 11,56 U/mL dan isolat bawang merah sebesar 9,74 U/mL.

Kata kunci: *Trichoderma* spp., protease, protein mikrobial

Abstract: *Proteases is very important due to their enormous industrial applications. Proteases present in all forms of life, they are produced by microorganisms, various plants and animals. Among them microbial proteases has attracted many attention due to higher productivity, easiness to produce, efficiency of growth and can use waste for substrate in the production process. One of microbe as source of protease is Trichoderma spp. This research uses 4 isolates of Trichoderma sp., isolated from bananas, pineapples, onion and ginger. This study was carried out to determine the proteolytic activity of Trichoderma spp. isolated from rhizosphere of plants. The proteolytic activity of the enzymes was determined based on the amount of tyrosin liberated in Unit/mL. The results showed that the Trichoderma spp isolate was able to produce protease. The specific activity of protease Trichoderma sp. Ginger, pineapple, banana and onion isolates were 12.95, 11.86, 11.56 and 9.74 U/mL, respectively.*

Keywords: *Trichoderma* spp., protease, microbial protein

PENDAHULUAN

Perkembangan industri protease berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri. Protease dapat diperoleh dari semua makhluk hidup, namun saat ini pemakai enzim banyak yang beralih pada enzim mikrobia. Keunggulan enzim microbial adalah produksi tinggi, kemudahan dan efisiensi dalam pengaturan pertumbuhan, limbah pertanian dapat dimanfaatkan sebagai sumber substrat (Soeka dkk. 2012). Enzim industrial di dominasi oleh protease mencapai 95% dari kebutuhan enzim dunia Bersama dengan karbohidrase dan lipase (Prawira & Rukmi 2015).

Protease dapat dihasilkan oleh tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease terbatas oleh tersedianya lahan tanam dan kondisi pertumbuhan yang sesuai, serta memerlukan waktu produksi enzim yang lama. Produksi protease dari hewan juga dibatasi oleh ketersediaan ternak penghasil enzim. Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling potensial dibandingkan tanaman dan hewan. Penggunaan mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan

hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetika (Said & Likadja 2012).

Kendala utama penggunaan mikroorganisme sebagai penghasil enzim dalam skala industri adalah tingginya biaya produksi yang diperlukan, karena terlalu rendahnya aktivitas protease yang didapatkan. Pemilihan biakan terseleksi dan pemanfaatan komoditi pertanian yang murah, tersedia dalam jumlah yang berlimpah dan cocok untuk media pertumbuhan mikroorganisme diharapkan dapat mengatasi kendala tersebut (Choliq 2008). Salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan adalah *Trichoderma*.

Trichoderma sp. merupakan salah satu agensia pengendali hayati yang telah banyak digunakan untuk mengendalikan mikroba patogen tanaman. Isolat *Trichoderma* yang digunakan berasal dari tanah perakaran tanaman (rizosfer). Jenis *Trichoderma* tersebut adalah *Trichoderma harzianum* isolat jahe yang berasal dari tanah perakaran tanaman jahe, *Trichoderma* sp. isolat nanas yang berasal dari tanah perakaran tanaman nanas, *T. harzianum* isolat pisang yang berasal dari tanah perakaran tanaman pisang, dan *T. harzianum* isolat bawang merah yang berasal dari tanah perakaran tanaman bawang merah. *Trichoderma* sp. mampu menghasilkan enzim protease. Protease merupakan enzim penting dalam siklus N yang berfungsi dalam transformasi organik nitrogen (protein) menjadi N inorganik (NH_4) pada fungi, yang kemudian NH_4 digunakan oleh tanaman (Meirinawati 2017).

Tinggi rendahnya aktivitas suatu enzim sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Menurut Oktavianti (2021) enzim dapat bekerja efektif pada suhu dan pH tertentu, yang disebut suhu dan pH optimum. Artinya semakin besar atau semakin kecil suhu/ pH tersebut keaktifannya akan berkurang. Perubahan suhu berarti memberi atau menarik kalor, yang mengakibatkan terbentuknya ikatan baru atau terputusnya ikatan lama, sehingga enzim tidak dapat lagi bekerja sebagai katalisator. Berdasarkan latar belakang di atas maka tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas protease dari beberapa isolat *Trichoderma* spp.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen rancangan acak lengkap (RAL) dengan uji *analysis of variance* (Anova).

Persiapan isolat *Trichoderma* spp.

Isolat jamur antagonis *Trichoderma* spp. yang digunakan adalah isolat jahe (*Zingiber officinale*), pisang (*Musa* sp.), nanas (*Ananas comosus*), dan bawang merah (*Allium cepa*). *Trichoderma* spp. diperoleh dari hasil isolasi sampel tanah dari kabupaten Temanggung. Medium PDA digunakan untuk mengisolasi dan mensubkultur *Trichoderma* yang didapat. Isolasi *Trichoderma* spp. dilakukan menggunakan metode pengenceran dan metode

tanam langsung. Metode isolasi langsung yaitu dengan cara mengambil 1 gram tanah masing-masing sampel lalu sebar dan ratakan pada medium PDA lalu diinkubasi pada suhu ruang. Jamur yang diduga *Trichoderma* spp. memiliki karakteristik seperti warnah hijau muda sampai tua, hifa menyebar cepat dan merata, bentuk koloni bulat (Soesanto dkk. 2013).

Pemuatan Medium Proteolitik

Medium yang digunakan dalam uji aktivitas protease adalah medium proteolitik agar dan medium proteolitik cair. Komposisi medium proteolitik agar terdiri dari $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; K_2HPO_4 0,7 g; KH_2PO_4 0,3 g; KCl 0,2 g; NH_4NO_3 1,0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; MnCl_2 0,01 g; ZnSO_4 0,001 g; susu skim 20 g; agar 20 g; 1 L akuades. Komposisi medium proteolitik cair sama dengan medium proteolitik agar namun tanpa penambahan agar. Medium proteolitik cair mempunyai pH 5,4; pH medium diukur dengan menggunakan pH meter.

Uji Aktivitas Protease Secara Kualitatif

Deteksi protease secara kualitatif dilakukan pada medium uji proteolisis agar dengan melihat ada tidaknya zona bening yang terbentuk.

Produksi Enzim Protease

Sebanyak 1 plug dari bor gabus (ϕ 5 mm) dari masing-masing isolat *Trichoderma* sp. yang berumur 5 hari diinokulasikan ke dalam medium uji proteolisis cair 20 mL. Inkubasi dilakukan pada shaker dilakukan pada suhu 27°C selama empat hari. pH medium setelah inkubasi diukur dengan menggunakan pH meter. *Trichoderma* spp. yang telah diproduksi dipisahkan antara pelet dan supernatannya dengan sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C. Supernatannya yang terbentuk merupakan sumber enzim yang selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas protease (Mishra 2010). Pelet hasil sentrifugasi ditimbang menggunakan timbangan analitik, hasil tersebut merupakan jumlah bobot basah.

Uji Aktivitas Protease Secara Kuantitatif

Kurva standar dibuat dengan membuat larutan induk tirosin 3 mg/mL. Larutan induk dibuat dengan cara melarutkan tirosin 60 mg ke dalam larutan HCl 0,1 M sebanyak 20 mL. Kurva standar tirosin dibuat dengan konsentrasi 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,30; 0,45; 0,6 mg/mL dengan cara mengambil larutan induk masing-masing sebanyak 0,00; 0,17; 0,30; 0,50; 0,67; 1,00; 1,50; 2,00 mL dan penambahan HCl masing-masing sebanyak 10,00; 9,83; 9,70; 9,50; 9,33; 9,00; 8,50; 8,00 mL. Masing-masing konsentrasi tersebut diukur absorbansinya pada 280 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan membuat persamaan liniernya (Yusriah & Kuswyatari 2013).

Deteksi aktivitas protease secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Substrat yang digunakan berupa kasein 1% dilarutkan dalam 100 mL akuades yang dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit dalam water bath dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan 10% TCA (Trichloro acetic acid) dibuat dengan dilarutkannya sebanyak 10 gram TCA dalam 100 mL akuades.

Penentuan aktivitas protease diukur dengan mencampurkan 0,4 mL sumber enzim masing-masing isolat ditambah 1,2 mL substrat kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu 40°C dan diakhiri dengan penambahan TCA sebanyak 2,5 mL serta 1 mL buffer posfat 50 mM pH 7. Seluruh perlakuan dihitung absorbansi pada panjang gelombang 280 nm (Yusriah & Kuswytasari 2013). Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per mL ekstrak enzim dengan persamaan (1).

$$\text{Aktivitas Unit (U/mL)} = [\text{tirosin}] \times \frac{V}{p \times q} \dots (1)$$

dengan: V = volume total sampel percobaan tiap tabung (mL)
p = Jumlah enzim (mL)
q = waktu inkubasi (menit)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Protease secara Kualitatif

Deteksi protease secara kualitatif dapat dilihat dengan menggunakan medium proteolisis agar. Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 1), keempat isolat *Trichoderma* sp. baik isolat pisang, isolat bawang merah, isolat nanas, dan isolat jahe mempunyai protease karena terbentuknya zona bening pada medium proteolisis agar. Terbentuknya zona bening pada medium proteolisis agar disebabkan adanya pemecahan kasein yang terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Zainuddin 2017), bahwa hilangnya partikel kasein dalam medium skim milk ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni.

Zona bening merupakan petunjuk bahwa fungsi tersebut memiliki aktivitas protease.

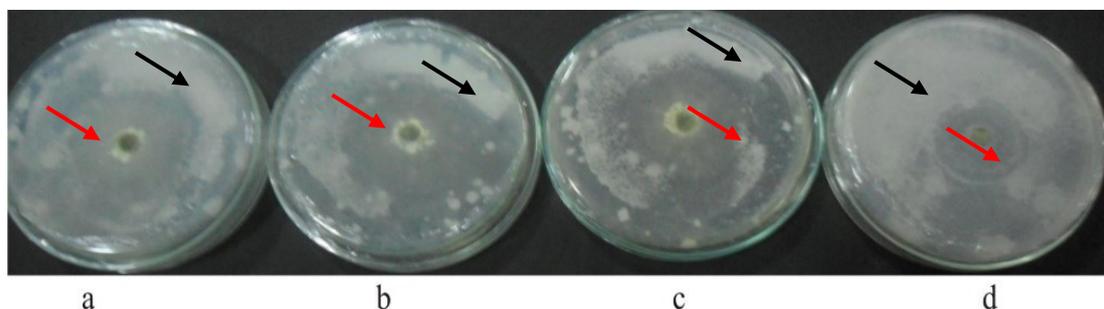
Aktivitas Protease Secara Kuantitatif

Tabel 1 menunjukkan bahwa keempat isolat *Trichoderma* sp. mempunyai aktivitas protease sama. Tidak ada isolat tertinggi atau terendah dalam menghasilkan aktivitas protease dari keempat isolat *Trichoderma* sp. Jumlah protease yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. isolat jahe adalah 12,95 U/mL. *Trichoderma* sp. isolat nanas sebesar 11,86 U/mL. *Trichoderma* sp. isolat pisang sebesar 11,56 U/mL dan *Trichoderma* sp. isolat bawang merah sebesar 9,74 U/mL. Hasil aktivitas protease yang dilakukan pada penelitian ini dimungkinkan belum mencapai titik optimum.

Tabel 1. Aktivitas protease beberapa isolat *Trichoderma* spp. setelah inkubasi empat hari

| Jenis Isolat | Aktivitas protease (U/ml) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat pisang | 11,56±1,33 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat bawang | 9,74±1,33 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat nanas | 11,86±1,33 ^a |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat jahe | 12,95±1,33 ^a |

Tidak adanya perbedaan yang nyata hasil aktivitas protease dari keempat isolat *Trichoderma* sp. tersebut disebabkan pH medium baik sebelum maupun sesudah perlakuan adalah sama. pH medium diawal sebelum inkubasi dari keempat isolat adalah 5,4 sedangkan pH medium yang dihasilkan setelah inkubasi 5 hari, adalah 8 (Tabel 2). Hal ini dikarenakan, pH 5,8 yang dihasilkan pada medium proteolitik cair setelah inkubasi *Trichoderma* spp. empat hari bukan merupakan pH optimum protease. Menurut Sumardi dkk. (2019) pH optimum aktivitas protease yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. adalah kisaran pH 6-7.



Gambar 1. Zona bening protease koloni isolat *Trichoderma* sp. pada medium proteolisis agar pada hari ke-7. Keterangan: (a) *Trichoderma* sp. isolat pisang, (b) *Trichoderma* sp. isolat bawang merah, (c) *Trichoderma* sp. isolat nanas, (d) *Trichoderma* sp. isolat jahe. Panah merah menunjukkan medium yang ditumbuhi *Trichoderma*, sedangkan panah hitam menunjukkan medium yang tidak ditumbuhi oleh *Trichoderma*.

Tabel 2. pH media proteolitik cair isolat *Trichoderma* spp. setelah inkubasi

| Jenis Isolat | pH media |
|--------------------------------------|-------------|
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat pisang | 8,57 ± 0,24 |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat bawang | 8,07 ± 0,24 |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat nanas | 8,10 ± 0,24 |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat jahe | 8,10 ± 0,24 |

Menurut Yusriah & Kuswyasari (2013) enzim ekstrak yang diujikan sebagai mikoparasit pada *Trichoderma* sp. lebih berpengaruh terhadap kisaran pH daripada pertumbuhan miseliumnya, oleh karena itu perbedaan bobot basah (berat kisaran 1,8-2,9 g) (Tabel 3) dari keempat *Trichoderma* sp. tersebut tidak berpengaruh pada jumlah protease yang dihasilkan.

Tabel 3. Jumlah bobot basah isolat *Trichoderma* spp. pada medium proteolitik agar setelah inkubasi

| Jenis Isolat | Bobot basah (g) |
|--------------------------------------|-----------------|
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat pisang | 2,573 ± 0,301 |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat bawang | 2,072 ± 0,301 |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat nanas | 2,634 ± 0,301 |
| <i>Trichoderma</i> sp. isolat jahe | 2,096 ± 0,301 |

KESIMPULAN

Jumlah protease yang dihasilkan oleh keempat *Trichoderma* sp. tidak berbeda nyata yaitu isolat jahe adalah 12,95 U/mL, isolat nanas sebesar 11,86 U/mL, isolat pisang sebesar 11,56 U/mL dan isolat bawang merah sebesar 9,74 U/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto menjadi tempat dalam melakukan penelitian

DAFTAR PUSTAKA

Choliq, A., 2008. Aktivitas enzim protease dari *Mucor javanicus* yang ditumbuhkan pada media tepung singkong (*Mannihot utilissima*). *Berita Biologi*. **9(3)**: 299-303.

- Meirinawati, H. (2017). Transformasi nitrogen di laut. *OSEANA*. **42(1)**: 36-46.
- Mishra, V.K. (2010). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytology*. **2(9)**: 28-35.
- Oktavianti, N. (2021) Materi Metabolisme Protein, Asam Amino dan Genetik. Fakultas Tarbiyah dan Keguruan. UIN Raden Intan Lampung. Bandar Lampung
- Prawira, I. & Rukmi, M.I. (2015). Produksi enzim protease *Aspergillus flavus* Pam-25 dengan variasi pH dan waktu inkubasi. *Jurnal Akademika Biologi*. **4(2)**: 10-16.
- Said, M.I. & Likadja, J.C. (2012). Isolasi dan identifikasi bakteri yang berpotensi sebagai penghasil enzim protease pada industri penyamakan kulit PT.Adhi Satria abadi (ASA), Yogyakarta. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pertenakan*. **2(9)**: 121-128.
- Soeka, Y.S., Rahayu, S.H., Setianingrum, N. & Naiola, E. (2011). Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam memproduksi enzim protease yang bersifat alkalin dan termofilik. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. **21(2)**: 89-95.
- Soesanto, L., Mugiastuti, E., Rahayuniati, R.F. & Dewi, R.S. (2013). Uji kesesuaian empat isolat *Trichoderma* spp. dan daya hambat *in vitro* terhadap beberapa patogen tanaman. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. **13(2)**: 117-123.
- Sumardi, S., Farisi, S., Ekowati, C.N. & Diana, M.S. (2019). Aktivitas dan karakterisasi enzim protease isolat *Bacillus* sp. (UJ132) secara kualitatif dan kuantitatif. *Jurnal Riset Akuakultur*. **14(3)**: 193-199.
- Yusriah, Y. & Kuswyasari, N.D. (2013). Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. **2(1)**: E48-E50.
- Zainuddin, M. (2017). Isolasi, seleksi dan identifikasi genotipik 16 S-rRNA bakteri proteolitik indogeneus dari ekosistem mangrove karimunjawa sebagai kandidat konsorsium probiotik untuk bioremediasi limbah organik tambak. *Akuatik: Jurnal Sumberdaya Perairan*. **11(1)**: 71-77