

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari *Penicillium sp.*

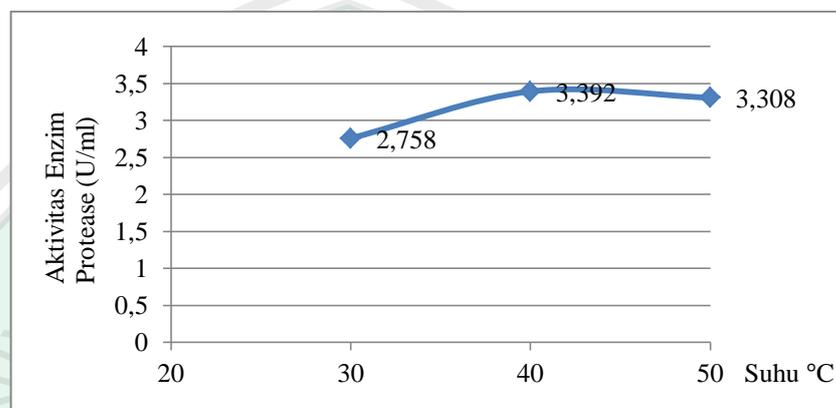
Enzim merupakan suatu protein yang memiliki aktivitas biokimia sebagai katalis suatu reaksi. Enzim sangat rentan terhadap kondisi lingkungan karena enzim merupakan protein. Adanya perubahan temperatur akan mengakibatkan aktivitas enzim ikut mengalami perubahan meskipun masih banyak lagi faktor lain yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim (Budiman, 2010).

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA, suhu optimum ekstrak enzim protease dari *Penicillium sp.* dapat ditunjukkan pada lampiran 3 tabel 1. Hasil yang ditunjukkan pada lampiran 3 tabel 1, menunjukkan bahwa terdapat pengaruh terhadap aktivitas enzim protease dari *Penicillium sp.*, hal tersebut ditunjukkan adanya signifikansi $< 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* untuk mengetahui perbedaan perlakuan dari masing-masing suhu. Hasil uji lanjut yang dilakukan dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease dari *Penicillium sp.*

No.	Suhu	Aktivitas Enzim (U/ml)	Notasi
1.	30°C	2,758	a
2.	40°C	3,391	b
3.	50°C	3,308	b

Aktivitas enzim protease dari *Penicillium* sp. dapat dilihat bahwa pada perlakuan suhu 30°C berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan suhu 40°C dan 50°C. Sedangkan suhu 40°C dan 50°C tidak berbeda yang nyata yaitu 3,391 U/ml dan 3,308 U/ml.



Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease dari *Penicillium* sp.

Kurva pada gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim pada suhu 30°C adalah 3,308 U/ml dan meningkat pada suhu 40°C yaitu sebesar 3,392 U/ml, tetapi pada suhu 50°C aktivitas enzim mengalami penurunan yaitu 3,308 U/ml. Aktivitas tertinggi enzim protease dari *Penicillium* sp. terdapat pada perlakuan suhu 40°C yaitu dengan nilai aktivitas enzim sebesar 3,391 U/ml.

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas protease adalah suhu. Adanya peningkatan suhu akan meningkatkan energi kinetik, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Akan tetapi, peningkatan suhu lebih lanjut akan menurunkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena enzim akan mengalami denaturasi. Enzim mengalami perubahan konformasi pada suhu yang terlalu tinggi, sehingga substrat terhambat dalam memasuki sisi aktif enzim (Yusriah dan Nengah, 2013).

Hasil penelitian ini memiliki aktivitas enzim protease yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yaitu penelitian Yusriah dan Nengah (2013) menjelaskan bahwa *Penicillium* sp. merupakan jenis kapang yang menghasilkan aktivitas enzim protease 2,416 U/ml pada suhu optimum 40°C. Sedangkan penelitian Gupta (2009) dan Haq (2006) suhu optimum aktivitas enzim protease oleh *Penicillium* sp. adalah 30°C.

Pengukuran aktivitas proteolitik secara kuantitatif tersebut dilakukan dengan menggunakan metode Bergneyer dan Grassal (1983), prinsip kerja metode ini adalah pengukuran asam amino tirosin yang terhidrolisis setelah dipisahkan dari substratnya. Pertama enzim akan memecah substrat kasein dengan bantuan air menjadi asam amino dan peptida. Laju pembentukan peptida inilah yang dijadikan tolok ukur aktivitas katalis protease. Asam amino yang terhidrolisis harus dipisahkan dari substrat atau protein lain yang terhidrolisis. Pemisahan dilakukan menggunakan *Trichloroacetic acid* (TCA), sehingga protein dan peptida yang berukuran besar akan mengendap. Penambahan TCA ini sekaligus untuk mengaktifasi enzim protease. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 275 nm. Besarnya serapan ini berbanding lurus dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis. Aktivitas protease dihitung dalam satuan U (unit) per ml ekstrak enzim. Satuan unit protease (U) didefinisikan sebagai banyaknya ml enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1µmol tirosin tiap menit dengan kasein sebagai substrat (Yusriah dan Nengah, 2013).

4.2 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari *Trichoderma* sp.

Suhu optimum ekstrak enzim protease dari *Trichoderma* sp. dapat dilihat pada lampiran 3 tabel 2, yang menunjukkan adanya pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease dari *Trichoderma* sp. hal tersebut ditunjukkan adanya signifikansi $< 0,05$ yang selanjutnya dilakukan uji lanjut dengan uji *Duncan Multiple Range Test (DMRT)*. Adapun notasi hasil uji lanjut disajikan pada tabel dibawah ini:

Tabel 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease dari *Trichoderma* sp.

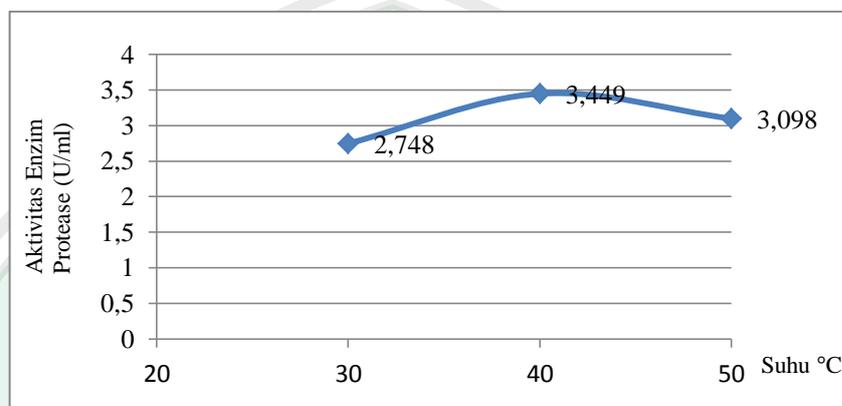
No.	Suhu	Aktivitas Enzim (U/ml)	Notasi
1.	30°C	2,748	a
2.	40°C	3,449	b
3.	50°C	3,098	ab

Hasil uji Duncan pada tabel 2 menunjukkan tidak beda nyata pada suhu 40°C dan suhu 50°C. Pada suhu 40°C aktivitas enzim protease adalah 3,449 U/ml dengan notasi b dan pada suhu 50°C adalah 3,098 U/ml dengan notasi ab.

Sedangkan pada suhu 30°C aktivitas enzim protease sebesar 2,748 U/ml dengan notasi a.

Perbedaan perlakuan suhu pada uji aktivitas enzim akan menghasilkan aktivitas enzim yang berbeda-beda sesuai dengan suhu optimum laju reaksi enzim tersebut. Hal ini dapat dilihat pada aktivitas enzim protease dari *Trichoderma* sp. yang pada setiap perlakuan memiliki aktivitas yang berbeda. Pada suhu 30°C aktivitas enzim protease dari *Trichoderma* sp. adalah sebesar 2,748 U/ml dan

mengalami peningkatan pada suhu 40°C yaitu 3,449 U/ml tetapi pada suhu 50°C aktivitas mengalami penurunan menjadi 3,098 U/ml. Sehingga aktivitas enzim protease dari *Trichoderma* sp. mencapai suhu optimum pada suhu 40°C. Kenaikan dan penurunan aktivitas enzim dapat dilihat pada gambar 5 dibawah ini:



Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease dari *Trichoderma* sp.

Aktivitas enzim optimum pada suhu 40°C dan menurun pada suhu 50°C, hal ini dikarenakan sebagian protein telah mengalami kerusakan atau terdenaturasi. Temperatur lingkungan yang meningkat di sekitar enzim akan menyebabkan putusnya ikatan hidrogen, ikatan ion atau interaksi hidrofobik sehingga struktur tersier enzim berubah, yang menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaan sehingga sisi aktif enzim berubah mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas enzim (Noviyanti dkk, 2012).

Suhu 40°C merupakan suhu optimum. Hal ini disebabkan energi aktivasi dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik molekul enzim maupun molekul substrat. Peningkatan energi molekul substrat akan meningkatkan laju reaksi enzim. Kenaikan temperatur menyebabkan aktivitas enzim meningkat, karena temperatur yang semakin tinggi akan meningkatkan

energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat, sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dan enzim. Sehingga produk yang terbentuk semakin banyak. Pada temperatur optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim substrat makin mudah dan produk yang terbentuk meningkat. Peningkatan temperatur melebihi temperatur yang optimum mengakibatkan enzim mengalami denaturasi dan substrat mengalami perubahan konformasi sehingga sisi aktif substrat tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim dan menyebabkan turunnya aktivitas enzim (Kosim dan Surya, 2010).

Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Shakeri dan Howard (2006) menjelaskan bahwa aktivitas protease *Trichoderma harzianum* strain 101645 sebesar 8.4 U/ml dan strain 206040 sebesar 11.3 U/ml pada suhu optimum 40°C yang ditumbuhkan pada media CD (*Czapek dox*). *Czapek* adalah media untuk enzim protease (Zanphorline *et al.*, 2011).

Komposisi media CD adalah Sakarosa merupakan sumber karbon, Natrium nitrat merupakan sumber nitrogen untuk pertumbuhan fungi, Dipotassium fosfat berfungsi sebagai agen buffer dan menstabilkan nutrisi, Kalium klorida merupakan sumber ion klorida, Magnesium sulfat dan Besi sulfat merupakan sumber kation (Eaton dan Baird, 2005). Sedangkan kasein adalah substrat murni enzim protease. Kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsium kalsinat (Suri dkk., 2013).

Apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya maka aktivitas enzim protease lebih tinggi menggunakan media *Czapek dox* dengan media limbah cair tahu dan dedak, karena pada media tersebut mengandung nutrisi yang seimbang untuk menghasilkan enzim protease dan media *Czapek dox* memiliki kandungan kasein yang tinggi. Menurut Suri dkk.(2013) kandungan kasein yang semakin tinggi akan menghasilkan aktivitas enzim protease yang tinggi. Dan apabila kandungan lemak suatu media dihilangkan akan menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi.

Enzim protease yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. termasuk golongan enzim protease mesozim. Menurut Volk dan Wheeler (1988), Semua enzim bekerja dalam rentang suhu tertentu pada tiap jenis mikroorganisme. Sebagian besar enzim memiliki aktivitas optimum pada suhu 20-50 °C termasuk dalam golongan mesozim. *Trichoderma* dapat tumbuh optimum pada suhu rendah sesuai spesiesnya (Danielson dan Davey, 2002).

4.3 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari campuran

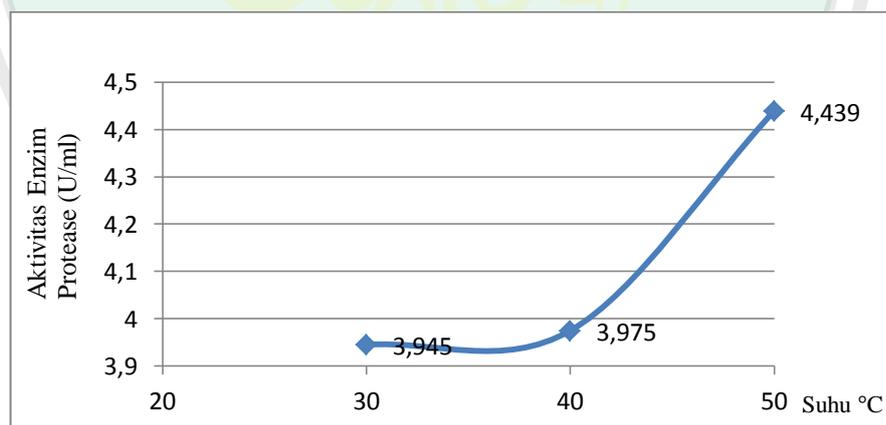
***Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp.**

Analisis statistik ANOVA dapat dilihat pada lampiran 3 tabel 3 yang menunjukkan adanya pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dari campuran *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. hal tersebut ditunjukkan adanya signifikansi $< 0,05$ yang kemudian dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* sehingga didapatkan notasi dari hasil uji tersebut. Adapun notasi hasil uji lanjut dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease dari campuran *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp.

No.	Suhu	Aktivitas Enzim (U/ml)	Notasi
1.	30°C	3,945	a
2.	40°C	3,975	a
3.	50°C	4,439	b

Hasil uji lanjut pada tabel 3 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata pada suhu 30°C dan 40°C tetapi ada perbedaan nyata pada suhu 50°C yaitu 4,439 U/ml dengan notasi b. Perbedaan yang signifikan pada pengaruh suhu terhadap campuran *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. adalah suhu 40°C dan 50°C.



Gambar 6. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim protease dari campuran *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp.

Perbedaan aktivitas enzim protease pada suhu 30, 40 dan 50°C dapat dilihat pada gambar 6, dimana semakin tinggi suhu yang diberikan maka akan semakin tinggi aktivitas enzimnya dan adanya perbedaan yang signifikan 3,975

U/ml pada suhu 40°C dan 4,439 U/ml pada suhu 50°C yang merupakan aktivitas tertinggi protease dari campuran *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. tetapi suhu optimum pada campuran kedua kapang ini belum diketahui.

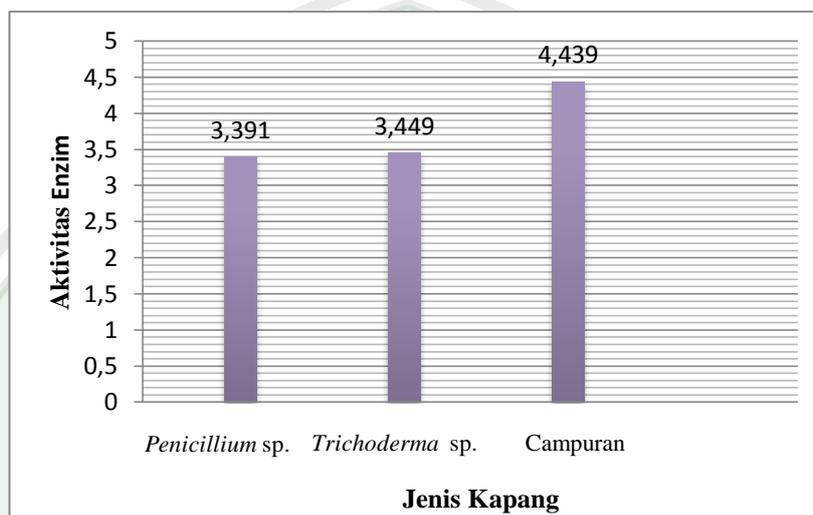
Apabila aktivitas enzim diukur dengan menghitung banyaknya substrat yang diubah dalam jangka waktu tertentu pada suhu yang berbeda, maka akan didapatkan suhu optimum. Suhu optimum ini adalah suhu pada saat laju reaksi enzim paling tinggi mengubah substrat dan merupakan hasil keseimbangan antara laju kenaikan aktivitas dan laju perusakan enzim (Bintang, 2010).

Kecepatan reaksi kimia akan meningkat dengan meningkatnya suhu karena akan mempercepat gerak termal molekul yang memiliki energi dalam jumlah yang cukup untuk memasuki keadaan transisi. Namun pada suhu 70-80°C enzim akan mengalami kerusakan yang mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim. Batasan ini tidak mutlak, karena ada enzim tertentu yang tahan terhadap pemanasan pada suhu tinggi yaitu enzim termostabil dan ada juga yang optimum pada suhu rendah yaitu mesozim (Palmer, 1981).

Enzim menyediakan banyak tempat untuk meningkatkan pengikatan proton karena enzim adalah protein yang tersusun oleh asam amino yang dapat mengikat proton pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lain. Gugus fungsional pada sisi aktif yang terionisasi yang dikatalisa oleh enzim (Suhartono, 1989).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan variasi suhu dan jenis kapang. Aktivitas enzim tertinggi dari 3 variasi perlakuan adalah pada variasi campuran kapang dari *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp.

yaitu sebesar 4,439 U/ml pada suhu 50°C apabila dibandingkan dengan *Penicillium* sp. adalah sebesar 3,391 U/ml pada suhu 40°C dan pada *Trichoderma* sp. adalah 3,449 U/ml pada suhu 30°C. Tetapi aktivitas campuran 2 kapang tersebut lebih rendah apabila dibandingkan dengan kondisi standart.



Gambar 7. Pebandingan hasil aktivitas enzim 1 jenis kapang dan campuran 2 kapang

Leng dan Yan (2011) menyatakan bahwa campuran 2 kapang dapat meningkatkan sintesis protease sehingga dapat meningkatkan aktivitas enzim tersebut. Selain itu hal ini didukung karena kedua kapang bekerja secara sinergis. Menurut Gubits dkk. (1997) *Trichoderma Harzianum* dan *Penicillium Simplicissimum* mampu bekerjasama secara sinergis.

Nilai aktivitas enzim dari tiap-tiap kapang berbeda-beda, hal ini menunjukkan bahwa kemampuan kapang melakukan metabolisme bervariasi. Seperti halnya enzim protease menghasilkan aktivitas enzim tergantung dari jenis kapang yang digunakan. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT dalam al-Qur'an surat Al-Qamar [54]: 49 yang berbunyi:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan ukurannya masing-masing. Seperti halnya dengan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh kapang. Setiap kapang proteolitik memiliki kemampuan mendegradasi protein yang berbeda-beda sesuai dengan jenis kapang dan substrat yang digunakan.

Selain variasi kapang campuran *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. yang menghasilkan enzim protease tertinggi, menggunakan media limbah cair tahu dan dedak yang murah dan mudah didapat juga membantu memberikan nutrisi untuk produksi enzim tersebut. Menurut Suprihatin (2010) dalam industri fermentasi dibutuhkan substrat yang murah, mudah didapat, dan penggunaannya efisien. Selain itu substrat yang digunakan harus dapat memenuhi kebutuhan senyawa karbon, tersedia sepanjang tahun, relatif stabil dan dapat disimpan selama beberapa bulan. Selain itu media yang digunakan harus dapat memenuhi senyawa karbon, nitrogen serta beberapa zat pertumbuhan yang diperlukan, misalnya asam amino esensial (Ferdiaz, 1988). Salah satu media yang dapat memberikan nutrisi adalah limbah cair tahu dan dedak.