

Optimasi Aktivitas Protease oleh *Bacillus sp.* MD24 menggunakan *Plackett Burman Design* (PBD) dan *Response Surface Methodology* (RSM)

Puji Putri Isnaini¹, Suharti Suharti¹, & Mieke Alvionita¹

¹ Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Indonesia.

Corresponding author: suharti.fmipa@um.ac.id

Article history

Received: 11 November 2024

Received in revised form: 10 December 2024

Accepted: 19 December 2024

DOI:

10.17977/um0260v8i22024p024

Kata-kata kunci:

Optimasi,

Aktivitas protease

PBD

CCD-RSM

Abstrak

Protease merupakan kelompok enzim yang memiliki fungsi katalitik untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Penelitian pendahuluan telah berhasil mengisolasi bakteri *Bacillus sp.* MD24 yang dapat menghasilkan protease pada fermentasi menggunakan metode Sub-merge Fermentation (SmF) dengan aktivitas 16,00 U/mL yang diukur menggunakan substrat kasein. Namun demikian, aktivitas protease yang dihasilkan tergolong rendah sehingga pada penelitian ini dilakukan optimasi kondisi aktivitas protease dari *Bacillus sp.* MD24. Faktor optimasi yang digunakan meliputi faktor: temperatur, pH dan penambahan ion logam. Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu regenerasi *Bacillus sp.* MD24, fermentasi protease dari *Bacillus sp.* MD24, optimasi aktivitas protease menggunakan metode OFAT (*One Factor at A Time*), PBD (*Plackett Burman Design*) dan CCD-RSM (*Central Composite Design-Response Surface Methodology*). Hasil penelitian Metode OFAT menghasilkan aktivitas optimum pada keadaan temperatur 37°C sebesar 544,70±10,48 U/mL; pH 8 sebesar 640,42±6,47 U/mL; CaCl₂ sebesar 609,04±4,60 U/mL.

Metode PBD menghasilkan faktor-faktor yang berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas protease yaitu temperatur, pH, dan penambahan ion Ca²⁺. Metode CCD-RSM memberikan hasil optimasi faktor-faktor yang berpengaruh signifikan terhadap aktivitas protease yaitu pada temperatur 53,81°C, pH 7,67 dan Ca²⁺ 0,57 mM menghasilkan aktivitas protease 715,96 U/mL yang lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas pada studi pendahuluan maupun yang diperoleh melalui optimasi menggunakan metode OFAT.

Abstract

Proteases are a group of enzymes that have a catalytic function to hydrolyse peptide bonds in proteins. Proteases are industrial enzyme that can be widely applied in chemical and biochemical processes with various advantages, namely the opportunity to produce a natural product under mild reaction conditions. Preliminary research has succeeded in isolating the bacterium *Bacillus sp.* MD24 which can produce proteases with an activity of 16,00 U/mL measured using casein substrates. The resulting protease activity is relatively low so that in this study optimization of protease activity from *Bacillus sp.* MD24. The optimization factors used include temperature, pH, and additional of metal ions. In this study, several stages were carried out, namely Regeneration of *Bacillus sp.* MD24, Fermentation of proteases from *Bacillus sp.* MD24, Optimization of protease activity using OFAT (*One Factor at A Time*), PBD (*Plackett Burman Design*) and CCD-RSM (*Central Composite Design-Response Surface Methodology*) methods. The results of the OFAT method produce optimum activity at a temperature of 37°C 544,70±10,48 U/mL; pH 8 of 640,42±6,47 U/mL; CaCl₂ of 609,04±4,60 U/mL. The PBD method produces factors that significantly affect the protease activity of *Bacillus sp.* MD24 temperature, pH, and the addition of Ca²⁺. The CCD-RSM method provides optimization result for factors that have a significant effect on protease activity at temperature 53,81 °C, pH 7,67 dan Ca²⁺ 0,57 mM resulting in protease activity of 715,96 U/mL which is higher than the activity in the preliminary study or obtained through optimization using the OFAT method.

PENDAHULUAN

Protease merupakan kelompok enzim yang memiliki fungsi katalitik untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Penjualan global protease mencapai 2,1 miliar USD dan diperkirakan akan meningkat hingga 4,6 miliar USD pada tahun 2033 [1]. Protease merupakan enzim industrial sehingga dapat diaplikasikan secara luas dalam proses kimia dan biokimia dengan berbagai keuntungan yaitu peluang menghasilkan suatu produk alami dalam kondisi reaksi ringan [2]. Pada bidang industri, protease telah banyak digunakan diantaranya industri makanan, industri farmasi, penyamakan kulit, pembuatan detergen, pembuatan pakan ternak dan pengolahan limbah [2–4].

Aplikasi protease mengakibatkan kebutuhan akan protease di Indonesia meningkat, namun hingga saat ini masih bergantung pada produksi impor [5]. Salah satu cara untuk menekan produksi impor dapat dilakukan dengan mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya yang dimiliki oleh Indonesia untuk memproduksi protease. Protease dapat diperoleh dari tumbuhan, hewan dan mikroorganisme [6]. Protease yang dihasilkan melalui proses fermentasi mikroba dianggap lebih menguntungkan karena membutuhkan waktu yang relatif singkat, proses produksi yang dapat dikontrol dan mudah untuk diproduksi dengan skala yang besar [7].

Penelitian pendahuluan telah berhasil mengisolasi bakteri penghasil protease dari tanah. Isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Bacillus sp.* MD24 yang dilaporkan menghasilkan protease ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri [8]. Selain itu, telah dilakukan percobaan optimasi aktivitas protease *Bacillus sp.* MD24 dengan proses fermentasi *solid-state fermentation* melalui metode *trial and error*, *One Factor at A Time* (OFAT) dan substrat kasein didapat aktivitas optimal pada variasi pH sebesar 17 U/mL pada pH 8. Pada variasi temperatur aktivitas optimal sebesar 16 U/mL pada temperatur 37°C. Namun aktivitas yang dihasilkan masih tergolong rendah dan belum diketahui adanya interaksi antar faktor yang digunakan, sehingga diperlukan studi lebih lanjut untuk mengetahui kondisi optimum dari faktor-faktor tersebut apabila diaplikasikan secara bersamaan.

Dengan adanya kekurangan metode OFAT maka dibutuhkan metode lain agar dapat diketahui kondisi optimum faktor-faktor tersebut. Hal yang perlu dilakukan adalah mempelajari apakah faktor-

faktor yang digunakan terhadap aktivitas dengan metode OFAT berpengaruh secara signifikan apabila diaplikasikan secara bersamaan, sehingga perlu dilakukan penelitian menggunakan metode yang dapat dianalisis secara statistik. Selanjutnya perlu dilakukan pengujian aktivitas dengan memvariasikan faktor-faktor tersebut secara bersamaan untuk mendapatkan kondisi yang optimum.

Metode yang sering digunakan untuk seleksi faktor-faktor yang berpengaruh secara signifikan dan menentukan kondisi optimum adalah *Design Plackett-Burman* (PBD) dan *Response Surface Methodology* (RSM) [9]. Kelebihan dari penggunaan PBD dan RSM yaitu dihasilkan data eksperimen yang baik dengan waktu yang singkat serta dapat diketahui variabel yang berpengaruh secara signifikan dan nilai optimum dari faktor yang signifikan pada aktivitas protease. Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* MD24 melalui PBD dan menentukan nilai optimum dari faktor-faktor yang berpengaruh menggunakan RSM.

METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah cawan petri, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, Beaker glass, pinset, Erlenmeyer, spatula, neraca analitik (KERN ABJ-NM), gelas ukur, pipet tetes, mikropipet 1000 µL (Vitlab), tip, mikrotub 1000 µL, *sentrifuge* (Precisa XT 120 A), *laminar air flow*, *vortex* (Dragon Lab MX-5), inkubator, *Incubator shaker* (New Brunswick), lampu spiritus dan korek api, autoklaf (Tomy), jarum ose, *hot plate* (Thermo Scientific), *Dri-Block* (TECHNEE), *magnetic stirrer*, pH meter, Oven (Memmert), spektrofotometer UV-Vis (Spektrofotometer Thermoscientific Genesys 20) dan kuvet.

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini merupakan bahan pro analisis (p.a). bahan tersebut meliputi media susu skim agar, NaCl (natrium klorida) MgSO₄ (magnesium sulfat), K₂HPO₄ (kalium hidrogen fosfat), Bacto peptone, yeast extract, media Luria Bertani (LB), bacto agar, asam klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH), asam sitrat, natrium sitrat, tris (hydroxymethyl aminomethane), glisin, asam trikloroasetat (TCA), Na₂CO₃, CaCl₂, ZnCl₂, MnCl₂.4H₂O, CoCl₂.2H₂O, NiCl₂.6H₂O, reagen Folin Ciocalteu (1:1), akuades,

bulu ayam domestik, dan kasein (Amresco:E666-500G).

Prosedur Penelitian

Regenerasi Bakteri *Bacillus sp.* MD24

Stok gliserol *Bacillus sp.* MD24 yang disimpan pada -80°C digunakan sebagai sumber mikroba. Regenerasi dilakukan secara aseptis, menggunakan media susu skim agar (SSA) yang mengandung susu skim 5%, bacto agar 2% dan MgSO_4 0,01%. Biakan murni isolat *Bacillus sp.* MD24 diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan pada permukaan media padat SSA yang steril. Media yang telah diinokulasi tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Fermentasi Protease dari Bakteri *Bacillus sp.* MD24

Fermentasi dilakukan menggunakan metode *Submerged Fermentation* (SmF). Sebelum dilakukan fermentasi, pembuatan media starter terlebih dahulu dilakukan dengan media LB (Luria Bertani) dan diinkubasi selama 6 jam dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dan kecepatan agitasi 100 rpm sampai OD600 sekitar 0,5 [12]. Kultur tersebut kemudian digunakan untuk fermentasi protease.

Produksi protease dilakukan menggunakan media produksi yang mengandung K_2HPO_4 0,05%; MgSO_4 0,1%; substrat bulu ayam 1% dan dilarutkan dalam buffer tris 100 mL 50 mM pH 8. Setelah diinokulasikan stater sebanyak 1%, media produksi diinkubasi dengan *shaker incubator* pada suhu 37°C dan kecepatan agitasi 100 rpm selama 3 hari. Larutan hasil fermentasi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada temperatur 4°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar protease yang kemudian akan diuji aktivitasnya.

Penentuan Aktivitas Enzim

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mengambil ekstrak kasar sebanyak 0,2 mL, ditambahkan dengan kasein 0,5 mL (1% b/v), dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C . TCA (10% b/v) ditambahkan sebanyak 1 mL ke dalam campuran untuk menghentikan reaksi enzimatik yang terjadi dan divorteks. Selanjutnya larutan uji diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Pembuatan larutan kontrol dilakukan sama seperti perlakuan, namun penambahan TCA 10% dilakukan sebelum penambahan kasein.

Larutan uji dan kontrol masing-masing dimasukkan dalam mikrotube dan disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C dan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan diambil 1mL lalu ditambahkan 2,5 mL Na_2CO_3 0,5M dan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu (1:1), kemudian divorteks dan diinkubasi pada ruang gelap selama 30 menit. Larutan uji dan kontrol diukur absorbansinya pada $\lambda=660$ nm. Absorbansi yang dihasilkan disubstitusikan pada persamaan regresi linier pada kurva standar tirosin sehingga didapatkan data konsentrasi tirosin dan dapat dihitung aktivitas enzim menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{(C \times \text{Ves})}{(\text{Ve} \times t)}$$

Keterangan :

- C = Konsentrasi tirosin ($\mu\text{g/mL}$)
- Ves = Volume total enzim-substrat (mL)
- t = Waktu inkubasi enzim-substrat (menit)
- Ve = Volume enzim (mL)

Optimasi Aktivitas Enzim Protease oleh *Bacillus sp.* MD24

One Factor at A Time :

a. Variasi Temperatur

Prosedur variasi temperatur dilakukan seperti pada tahap penentuan aktivitas enzim, namun suhu yang digunakan pada saat inkubasi bervariasi yaitu, 27°C , 32°C , 37°C , 42°C , 47°C dan 52°C . pH larutan buffer yang digunakan untuk melarutkan kasein untuk variasi temperatur yaitu pH 8 dan pengujian dilakukan dengan tidak menambahkan ion logam.

b. Variasi pH

Prosedur variasi pH dilakukan seperti pada tahap penentuan aktivitas enzim, namun larutan buffer yang digunakan untuk melarutkan kasein digunakan variasi yaitu, buffer sitrat pH 6, buffer tris-HCl pH 7, buffer tris-HCl pH 8, buffer glisin-NaOH pH 9, dan buffer glisin-NaOH 10. Temperatur yang digunakan pada saat inkubasi yaitu 37°C dan tanpa penambahan ion logam.

c. Variasi penambahan ion logam

Prosedur variasi penambahan ion logam dilakukan seperti pada tahap penentuan aktivitas enzim, namun penambahan ion logam dilakukan setelah menambahkan ekstrak kasar enzim. Ion logam umumnya ditambahkan dalam bentuk garam yaitu CaCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 dan ZnCl_2 dengan

konsentrasi masing-masing ion logam yaitu 1 mM dan 0,5mM. pH yang digunakan untuk melarutkan substrat kasein yaitu 8 dan temperatur untuk inkubasi yaitu 37°C.

Placket Burman Design :

Dilakukan skrining dengan desain Placket Burman menggunakan 2 level dari masing-masing variabel sebagai low level [-1] dan high level [+1] yang ditentukan berdasarkan hasil dari OFAT, untuk temperatur masing-masing 27°C dan 37°C, untuk pH menggunakan pH 8 dan 10 sedangkan ion logam dipilih CaCl₂ dengan low level 0,5 mM dan high level 1 mM. Variabel-variabel tersebut dikombinasikan secara acak melalui software Minitab 20 dan dihasilkan desain pada **Tabel 1** yang akan diterapkan untuk percobaan di laboratorium dengan tiga kali pengulangan (proses run). Setelah dilakukan percobaan akan menghasilkan aktivitas protease dari setiap running. Hasil aktivitas protease di masukkan ke dalam software Minitab 20 dan diproses secara statistika.

Tabel 1. Desain percobaan skrining faktor yang berpengaruh terhadap aktivitas protease *Bacillus sp.* MD24 menggunakan Placket Burman

Run	Temperatur (°C)	pH	CaCl ₂ (mM)
1	37	8	1,00
2	37	10	0,50
3	27	10	1,00
4	37	8	1,00
5	37	10	0,50
6	37	10	1,00
7	27	10	1,00
8	27	8	1,00
9	27	8	0,50
10	37	8	0,50
11	27	10	0,50
12	27	8	0,50

Central Composite Design-Response Surface Methodology :

CCD-RSM digunakan untuk verifikasi secara statistik faktor signifikan yang dihasilkan dari PBD yaitu temperatur, pH dan konsentrasi CaCl₂. CCD-RSM menentukan nilai optimum kondisi aktivitas protease yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* MD24 menggunakan software Minitab 20. Sebanyak 20 set percobaan (**Tabel 2**) dengan 5 level (**Tabel 3**) dan 6 pengulangan percobaan pada titik pusat yang digunakan untuk menentukan nilai optimum tiap faktor.

Tabel 2. Desain percobaan penentuan kondisi optimum aktivitas protease *Bacillus sp.* MD24 CCD-RSM

Run	Temperatur (°C)	pH	CaCl ₂ (mM)
1	27,00	7,00	0,50
2	47,00	7,00	0,50
3	27,00	9,00	0,50
4	47,00	9,00	0,50
5	27,00	7,00	1,50
6	47,00	7,00	1,50
7	27,00	9,00	1,50
8	47,00	9,00	1,50
9	20,20	8,00	1,00
10	53,80	8,00	1,00
11	37,00	6,32	1,00
12	37,00	9,68	1,00
13	37,00	8,00	0,159
14	37,00	8,00	1,84
15	37,00	8,00	1,00
16	37,00	8,00	1,00
17	37,00	8,00	1,00
18	37,00	8,00	1,00
19	37,00	8,00	1,00
20	37,00	8,00	1,00

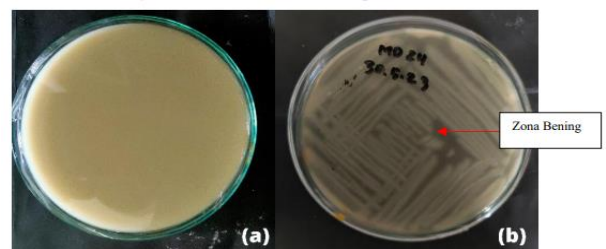
Tabel 3. Faktor dan level pada CCD-RSM

Faktor	-α	-1	0	+1	+α
Temperatur °C	20,20	27,00	37,00	47,00	53,80
pH	6,32	7,00	8,00	9,00	9,68
CaCl ₂ (mM)	0,169	0,50	1,00	1,50	1,84

HASIL DAN PEMBAHASAN

Regenerasi Bakteri *Bacillus sp.* MD24

Regenerasi bakteri *Bacillus sp.* MD24 dilakukan pada media susu skim agar (SSA), hal ini dilakukan supaya didapatkan biakan yang masih segar sehingga dapat memproduksi protease secara optimal. **Gambar 1.a** adalah media SSA yang belum diinokulasi dengan isolat mikroba. Media SSA berwarna putih keruh mengandung kasein yang teremulsi dalam air. **Gambar 1.b** merupakan biakan hasil regenerasi bakteri *Bacillus sp.* MD24. Adanya zona bening menandakan aktivitas protease dihasilkan oleh pertumbuhan koloni bakteri yang menghidrolisis emulsi kasein menjadi asam amino dan polipeptida pendek yang larut. Asam amino-asam amino menjadi sumber nutrisi bagi bakteri sehingga dapat bertahan hidup.

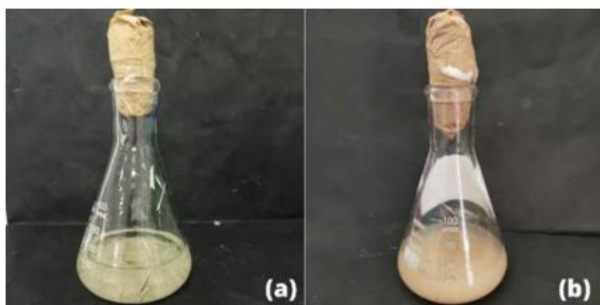


Gambar 1. (a) Media SSA (Susu Skim Agar) belum ditumbuhi bakteri (b) Media SSA yang telah ditumbuhi *Bacillus sp.* MD24

Fermentasi Protease dari Bakteri *Bacillus sp.* MD24

Proses fermentasi protease dilakukan menggunakan metode *Submerged Fermentation* (SmF) dengan media yang berisi bulu ayam sebagai sumber karbon dan nitrogen sedangkan larutan garam sebagai sumber mineral. Bulu ayam yang terkandung dalam media produksi merupakan *inducer* bagi *Bacillus sp.* MD24 agar gen protease terekspresi dan dapat memproduksi protease, karena bulu ayam memiliki kandungan protein sebanyak 92% [10].

Pada penelitian ini digunakan bulu ayam seberat 0,5 gram dengan 50 mL larutan garam. Pada **Gambar 2. (a)** media produksi belum diinokulasikan dengan *Bacillus sp.* MD24, terlihat larutan jernih tidak berwarna dan bulu ayam masih utuh. Setelah diinokulasikan *Bacillus sp.* MD24 pada media produksi dan diinkubasi selama 3 hari (**Gambar 2. (b)**) terjadi perubahan pada media produksi yaitu larutan menjadi keruh dan bulu ayam menjadi hancur. Perubahan ini menandakan adanya pertambahan jumlah sel mikroba dan terdegradasinya bulu ayam oleh enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* MD24.



Gambar 2. (a) Media Produksi (b) Media Produksi setelah Inkubasi 3 Hari

Hasil fermentasi disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan sel dan partikulat yang tidak larut sehingga dihasilkan supernatan dan pelet. Sentrifugasi pada suhu dingin dilakukan untuk menjaga agar enzim tidak rusak atau terdenaturasi oleh perubahan suhu. Supernatan yang diperoleh disebut dengan ekstrak kasar protease, yang selanjutnya akan digunakan untuk uji aktivitas enzim.

Optimasi Aktivitas Enzim Protease oleh *Bacillus sp.* MD24

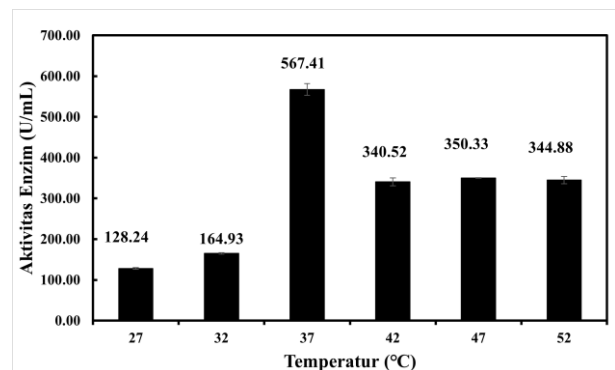
One Factor at A Time :

Pengukuran aktivitas protease dipengaruhi oleh faktor kondisi lingkungan, sehingga perlu dilakukan

optimasi untuk mendapatkan nilai aktivitas protease dengan hasil yang maksimal dan waktu yang singkat. Tahap awal yaitu melakukan trial and error menggunakan metode OFAT, yang berarti menguji satu per satu faktor diduga berpengaruh terhadap aktivitas protease yaitu, temperatur, pH dan penambahan ion logam.

a. Variasi Temperatur

Suatu enzim memiliki aktivitas maksimum pada temperatur tertentu. Aktivitas enzim akan meningkat dengan meningkatnya temperatur hingga temperatur optimum tercapai. Ekstrak kasar yang diperoleh diuji aktivitasnya dengan melakukan variasi temperatur pada saat inkubasi yaitu, 27°C, 32°C, 37°C, 42°C, 47°C dan 52°C. Variabel lainnya sebagai variabel moderator yaitu pH 8 dan tanpa penambahan ion logam



Gambar 3. Grafik Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Protease

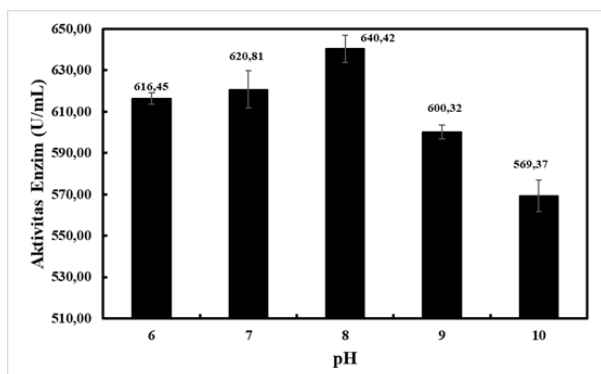
Berdasarkan **Gambar 3** temperatur optimum aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* MD24 yaitu 37°C dengan aktivitas $567,41 \pm 10,48$ U/mL. Peningkatan temperatur lebih lanjut menyebabkan penurunan aktivitas enzim, begitu pula pada temperatur dibawah titik optimum mengakibatkan aktivitas enzim sangat rendah yaitu 27°C dengan aktivitas $128,24 \pm 2,16$ U/mL, hal ini diakibatkan pada temperatur dibawah titik optimum enzim energi aktivasi yang tersedia lebih rendah [11].

Hasil temperatur optimum ini berbeda dengan penelitian yang menggunakan *Bacillus sp.* ZJ1502 yang diisolasi dari makanan tahu fermentasi dihasilkan temperatur optimal yaitu pada 40°C [12]. Penelitian lain yang dilakukan menggunakan *Bacillus sp.* RCM-SSR-102 yang diisolasi dari tempat pembuangan limbah unggas di Manipur, India memiliki temperatur optimal 50°C [13]. Berdasarkan penelitian terdahulu diketahui bahwa protease yang dihasilkan dari spesies yang sama

dapat memiliki kondisi temperatur optimal yang berbeda.

b. Variasi pH

Enzim akan bekerja aktif pada keadaan pH optimumnya. Ketika pH optimum tercapai, enzim memiliki struktur 3D paling baik untuk mengikat substrat. Setiap enzim dapat memiliki nilai pH optimum yang berbeda. Untuk mengetahui pH optimum dari enzim protease yang dihasilkan, pengaruh pH pada aktivitas enzim dipelajari pada kisaran pH 6-10 menggunakan buffer yang berbeda. Variabel lainnya sebagai variabel moderator yaitu temperatur inkubasi 37°C dan tanpa penambahan ion logam.



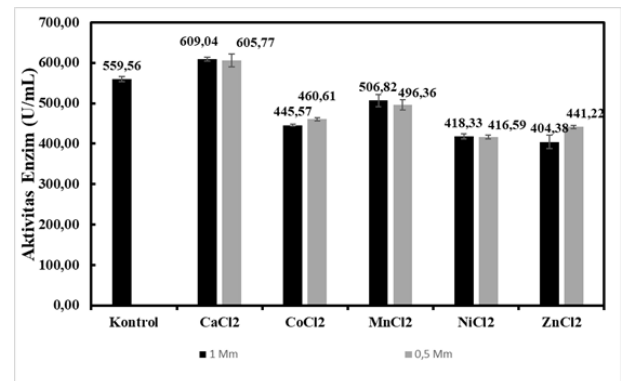
Gambar 4. Grafik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Protease

Pengaruh pH terhadap aktivitas protease ditunjukkan pada **Gambar 4**, Enzim memiliki aktivitas pada kisaran pH yang luas dari 6-10 yang menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan dapat diterapkan dalam industri untuk berbagai tujuan [14]. Aktivitas kecil pada pH rendah dan meningkat hingga diperoleh aktivitas maksimum pada pH 8 yaitu $640,42 \pm 6,47$ U/mL. Selanjutnya, kenaikan pH mengakibatkan turunnya aktivitas enzim. Hasil serupa telah dilaporkan oleh Avci dkk. (2020) aktivitas protease maksimum pada pH 8 yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* EBTA6 yang diisolasi dari makanan fermentasi [14]. Penelitian yang dilakukan oleh Furhan dkk. (2019) menggunakan isolat *Bacillus sp.* AP1 yang diisolasi dari Gunung Kashmir, India diketahui memiliki aktivitas optimum pada pH 9 [15].

c. Variasi Ion logam

Pengaruh ion logam pada aktivitas enzim dapat berubah tergantung pada sumber enzim [14]. Pengaruh penambahan berbagai ion logam terhadap aktivitas protease yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* MD24 ditunjukkan pada **Gambar 5**. Ion logam yang digunakan meliputi CaCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 dan ZnCl_2 dengan konsentrasi 1 mM dan 0,5

mM. Peningkatan aktivitas protease terjadi pada penambahan Ca^{2+} baik dalam konsentrasi 1 mM dan 0,5 mM dengan aktivitas masing-masing $609,04 \pm 4,623$ U/mL dan $605,77 \pm 15,411$ U/mL. Pada penelitian Riesmi dkk. (2019) penambahan ion Ca^{2+} mampu meningkatkan aktivitas protease yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* MD24 sebesar $4 \times$ lipat, sedangkan pada penelitian ini aktivitas hanya meningkat $1,08 \times$. Hal ini kemungkinan disebabkan karena enzim telah hampir tersaturasi oleh ion Ca^{2+} , sehingga penambahan ion Ca^{2+} tidak berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas enzim.



Gambar 5. Grafik Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Protease

Penurunan aktivitas protease terjadi pada penambahan CoCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 dan ZnCl_2 di kedua konsentrasi. Aktivitas protease yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* ZJ1502 pada penelitian Yu dkk. (2018) meningkat 21% ketika dilakukan penambahan Mn^{2+} yang mungkin dikarenakan Mn^{2+} dapat meningkatkan proses pengikatan substrat di sisi aktif enzim [12]. Beberapa ion logam yang menurunkan aktivitas protease dikarenakan ion logam mengganggu stabilitas struktur 3D dari protease yang mengakibatkan rusaknya jembatan garam pada struktur 3D protease dan terjadinya denaturasi enzim.

Analisis mendalam perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh ion logam yang terikat pada enzim yang berperan sebagai kofaktor. Analisis tersebut dapat dilakukan melalui proses rekonstitusi [16]. Ion logam yang terkandung pada enzim akan diikat oleh penambahan EDTA. EDTA merupakan agen pengkelat yang dapat mengikat dan menarik ion logam yang terkandung pada enzim salah satunya protease [17]. Setelah penambahan EDTA dilakukan rekonstitusi dengan menambahkan ion logam pada enzim yang telah kehilangan ion logam. Proses rekonstitusi dengan menggunakan ion logam yang sesuai akan membuat enzim mengikat kembali ion logam pada sisi pengikatannya sehingga dapat

memperbaiki struktur 3D enzim dan meningkatkan aktivitas enzim kembali.

Placket Burman Design :

PBD dilakukan untuk mengetahui hubungan linear yang signifikan dari variabel yang mempengaruhi aktivitas protease. PBD terdiri dari 12 set percobaan, 3 faktor yang dipilih berdasarkan hasil dari metode OFAT dengan masing-masing faktor memiliki 2 level dan memberikan respon berupa aktivitas protease yang terdapat pada **Tabel 4**. Berdasarkan tabel tersebut diketahui respon aktivitas yang diperoleh bervariasi dari 360,356±9,61 U/mL hingga 683,57±12,02 U/mL. Respon selanjutnya dievaluasi secara statistik dan didapatkan data melalui hasil diagram dan Analisis of Variance (ANOVA). Diagram pareto menunjukkan besarnya dan pentingnya suatu faktor. Suatu faktor dikatakan signifikan terhadap respons apabila melewati garis referensi yaitu pada 2,31 [18]. Diagram pareto pada **Gambar 6** menggambarkan pengaruh 3 faktor terhadap aktivitas protease. Diketahui ketiga faktor berpengaruh secara signifikan dan temperatur merupakan faktor yang paling efektif dalam menaikkan aktivitas.

Data ANOVA ditunjukkan pada **Tabel 5**. *P-value* pada hasil ANOVA digunakan untuk menganalisis hubungan antara faktor-faktor terhadap respon dengan tingkat kepercayaan 90% atau lebih [19]. *P-value* <0,05 menunjukkan pengaruh signifikan dari suatu faktor terhadap respon [20]. Berdasarkan Tabel 8 diketahui *p-value* untuk temperatur, pH, dan CaCl₂ memenuhi syarat *P*<0,05 dan dapat dikatakan bahwa ketiga faktor tersebut berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas protease yang dihasilkan *Bacillus sp.* MD24. *Lack of fit* memiliki arti penyimpangan atau ketidaktepatan terhadap model yang digunakan untuk menentukan kecocokan model yang digunakan [21]. *P-value* pada *Lack of Fit* yaitu 0,239 dimana *P*>0,05 atau dapat dikatakan tidak signifikan sehingga model yang digunakan tidak memiliki penyimpangan yang signifikan dan dapat memberikan prediksi respon dengan valid.

Analisis pada PBD menghasilkan model matematika berupa persamaan liner yang didapat yaitu :

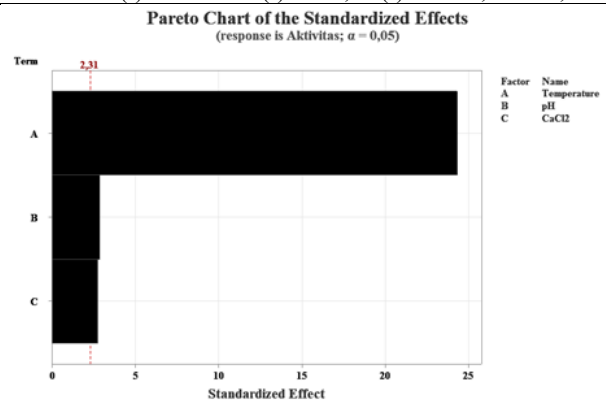
$$\text{Aktivitas} = - 147,00 + 23,534 \text{ Temperatur} - 13,97 \text{ pH} + 53,30 \text{ CaCl}_2$$

Persamaan tersebut menunjukkan bahwa kenaikan temperatur diikuti dengan kenaikan aktivitas

protease pada batas level yang digunakan pada penelitian yaitu 27-37°C, dan kenaikan pH diikuti dengan penurunan aktivitas enzim antara 2 level yang digunakan dalam penelitian yaitu pada rentang 8-10, serta kenaikan konsentrasi CaCl₂ diikuti dengan kenaikan aktivitas protease pada batas level yang digunakan yaitu 0,5-1mM.

Tabel 4. Hasil Aktivitas Enzim menggunakan PBD

Run	Temperatur (°C)	pH	CaCl ₂ (mM)	Aktivitas Enzim (U/mL)
1	37 (+)	8 (-)	1,00 (+)	683,57 ± 12,02
2	37 (+)	10 (+)	0,50 (-)	617,68 ± 2,05
3	27 (-)	10 (+)	1,00 (+)	413,39 ± 8,23
4	37 (+)	8 (-)	1,00 (+)	655,31 ± 10,60
5	37 (+)	10 (+)	0,50 (-)	619,13 ± 13,30
6	37 (+)	10 (+)	1,00 (+)	622,47 ± 12,70
7	27 (-)	10 (+)	1,00 (+)	404,81 ± 12,50
8	27 (-)	8 (-)	1,00 (+)	413,53 ± 11,70
9	27 (-)	8 (-)	0,50 (-)	411,06 ± 11,70
10	37 (+)	8 (-)	0,50 (-)	621,02 ± 14,30
11	27 (-)	10 (+)	0,50 (-)	360,35 ± 9,61
12	27 (-)	8 (-)	0,50 (-)	412,52 ± 10,20



Gambar 6. Diagram Pareto PBD

Tabel 5. Analysis of Variance PBD

Source	f-Value	p-Value
Model	202,61	0,000
Linear	202,61	0,000
Temperatur	591,91	0,000
pH	8,35	0,020
CaCl ₂	7,58	0,025
Lack-of-Fit	2,14	0,239

Response Surface Methodology-Central Composite Design :

Penentuan nilai optimum dari faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas protease dari *Bacillus sp.* MD24 dilakukan menggunakan CCD-RSM. CCD terdiri dari 20 set percobaan dan 3 faktor signifikan yang dihasilkan dari metode PBD dengan masing-masing faktor memiliki 5 level dan memberikan respon berupa aktivitas protease yang terdapat pada **Tabel 6**. Berdasarkan tabel tersebut diketahui respon aktivitas yang diperoleh bervariasi

dari 276,2±6,79 U/mL hingga 671,0±7,85 U/mL. Respon selanjutnya dievaluasi secara statistik dan didapatkan data *Analysis of Variance* (ANOVA) (**Tabel 7**), model persamaan matematika dan *surface area*.

Tabel 6. Hasil Aktivitas Enzim menggunakan CCD-RSM

Run	Temperatur (°C)	pH	CaCl ₂ (mM)	Aktivitas Enzim (U/mL)
1	27,00	7,00	0,50	334,40 ± 29,80
2	47,00	7,00	0,50	641,10 ± 9,46
3	27,00	9,00	0,50	314,60 ± 16,70
4	47,00	9,00	0,50	608,60 ± 20,50
5	27,00	7,00	1,50	276,20 ± 6,79
6	47,00	7,00	1,50	605,60 ± 8,50
7	27,00	9,00	1,50	287,80 ± 8,52
8	47,00	9,00	1,50	571,60 ± 6,20
9	20,20	8,00	1,00	509,10 ± 17,80
10	53,8	8,00	1,00	671,00 ± 7,85
11	37,00	6,32	1,00	382,00 ± 3,30
12	37,00	9,68	1,00	462,30 ± 39,60
13	37,00	8,00	0,159	450,20 ± 10,20
14	37,00	8,00	1,84	460,40 ± 44,20
15	37,00	8,00	1,00	449,40 ± 2,76
16	37,00	8,00	1,00	448,60 ± 1,33
17	37,00	8,00	1,00	450,50 ± 5,76
18	37,00	8,00	1,00	439,60 ± 32,00
19	37,00	8,00	1,00	446,80 ± 9,67
20	37,00	8,00	1,00	448,80 ± 0,87

Tabel 7. *Analysis of Variance* CCD-RSM

Source	F-Value	P-Value
Model	4,84	0,011
Linear	11,98	0,001
Temperatur	35,54	0,000
pH	0,04	0,842
CaCl ₂	0,37	0,557
Square	2,49	0,120
Temperatur*Temperatur	5,93	0,035
pH*pH	0,86	0,375
CaCl ₂ *CaCl ₂	0,07	0,798
2-Way Interaction	0,04	0,988
Temperatur*pH	0,06	0,805
Temperatur*CaCl ₂	0,01	0,908
pH*CaCl ₂	0,04	0,838
Lack-of-Fit	575,99	0,000

Pada metode RSM, ANOVA digunakan untuk menentukan model dan nilai signifikansi dari faktor baik linier, kuadrat maupun interaksi faktor yang berpengaruh terhadap respon dan dapat digunakan untuk menentukan kondisi optimum dari masing-masing faktor. Berdasarkan **Tabel 7** model yang memiliki nilai *P-value*<0,05 dianggap sebagai model yang disarankan dimana nilai ini berarti ketidaktepatan model yang digunakan kurang dari 5%.

Model *square* digunakan untuk mengetahui pengaruh kuadrat dari masing-masing faktor. Pada **Tabel 10**, model *square* untuk temperatur memiliki nilai *P-value*<0,05 yang berartikan model berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas

protease yang dihasilkan. Untuk pH dan CaCl₂ berdasarkan ANOVA dinilai tidak signifikan pada rentang yang digunakan karena memiliki nilai

P-value>0,05. Tidak signifikannya kedua faktor tersebut dapat dikarenakan nilai alfa yang dimiliki pada desain CCD sehingga berpengaruh pada interaksi antar variabel. *Lack of Fit* dari model RSM yang digunakan signifikan karena memiliki nilai *p-value*>0,05 sehingga model yang digunakan dianggap masih memiliki penyimpangan. Penggunaan metode BBD-RSM disarankan untuk dilakukan karena pada metode tersebut tidak menggunakan nilai alfa sehingga dapat mencegah potensi kehilangan data ketika prediksi yang diberikan model kurang sesuai.

Analisis pada RSM juga menghasilkan model matematika berupa persamaan yang didapat yaitu :

$$\text{Aktivitas} = -516 - 16,7 \text{ Temperatur} + 278 \text{ pH} - 85 \text{ CaCl}_2 + 0,430 \text{ Temperatur*Temperatur} - 16,4 \text{ pH*pH} - 18,6 \text{ CaCl}_2*\text{CaCl}_2 - 0,60 \text{ Temperatur*pH} + 0,56 \text{ Temperatur*CaCl}_2 + 10,0 \text{ pH*CaCl}_2$$

Persamaan tersebut menunjukkan bahwa respon yang berupa aktivitas protease akan meningkat berbanding lurus dengan peningkatan faktor yang ditunjukkan dengan nilai konstanta yang positif (+) dan aktivitas protease akan menurun berbanding lurus dengan penurunan faktor yang ditunjukkan dengan nilai konstanta negatif (-).

Hasil aktivitas protease yang dipengaruhi oleh temperatur, pH dan CaCl₂ diplot menggunakan software Minitab 20 untuk mempelajari efek dari faktor dan interaksi terhadap hasil aktivitas yang disajikan pada **Gambar 7**. **Gambar 7(a)** menunjukkan plot permukaan yang ditujukan untuk menghasilkan aktivitas dengan berbagai temperatur dan pH pada konsentrasi CaCl₂ tetap 1 mM. **Gambar 7(b)** menunjukkan plot permukaan yang ditujukan untuk menghasilkan aktivitas dengan berbagai temperatur dan konsentrasi CaCl₂ pada pH tetap 8. Dan **Gambar 7(c)** menunjukkan plot permukaan yang ditujukan untuk menghasilkan aktivitas dengan berbagai pH dan konsentrasi CaCl₂ pada temperatur tetap 37°C. Berdasarkan *surface plot* pada **Gambar 7(a) dan (b)** terlihat bahwa nilai level temperatur perlu ditinjau ulang karena belum menunjukkan pola dengan nilai optimum yang nyata/ pola gaussian.

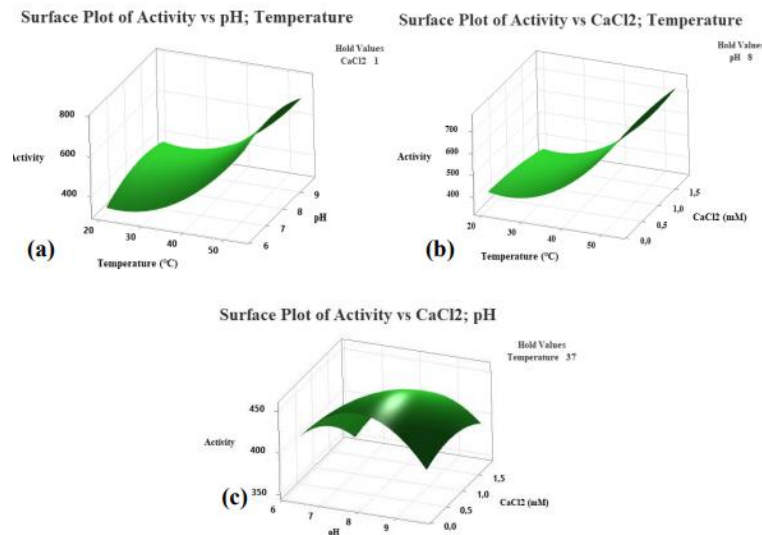
Setelah dilakukan berbagai proses analisis, software Minitab 20 akan memberikan hasil optimasi dari desain yang diberikan dan prediksi hasil aktivitas yang terdapat pada **Tabel 8**. Prediksi

tersebut telah divalidasi dengan cara melakukan pengujian di laboratorium menggunakan kondisi faktor-faktor yang ditentukan oleh RSM dan didapatkan nilai aktivitas aktual sebesar 715,96 U/mL. Nilai yang didapatkan tidak jauh berbeda dan memiliki tingkat kesamaan sebesar 94,7% dengan model yang ditentukan oleh RSM. Aktivitas tersebut memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas pada studi pendahuluan maupun yang diperoleh melalui metode OFAT. Sehingga,

optimasi aktivitas protease dari *Bacillus sp.* MD24 menggunakan CCD-RSM dapat diterima.

Tabel 8. Nilai optimum faktor dan respon

Solusi on	Temperatur	pH	CaCl ₂	Acti vity Fit	Actual Acti vity
Opti mum	53,81°C	7,677	0,568	755,5	715,96



Gambar 7. Surface Plot (a) Aktivitas terhadap temperatur dan pH (b) Aktivitas terhadap Temperatur dan CaCl₂ (c) Aktivitas terhadap pH dan CaCl₂

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu metode OFAT mengasilkan aktivitas optimum pada keadaan temperatur 37°C sebesar 544,7±10,48 U/mL; pH 8 sebesar 640,31± 6,47 U/mL. Metode *Plackett Burman Design* (PBD) menghasilkan faktor-faktor yang berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas protease dari *Bacillus sp* MD24 yaitu temperatur, pH, dan penambahan ion Ca²⁺. Metode Central Composite Design-Response Surface Methodology (CCD-RSM) memberikan hasil optimasi faktor-faktor yang berpengaruh signifikan terhadap aktivitas protease yaitu pada temperatura 53,81°C, pH 7,67 dan Ca²⁺ 0,568 mM menghasilkan aktivitas protease 715,96 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] "Protease Market Size, Share, Trends & Forecast – 2033 | FMI." <https://www.futuremarketinsights.com/reports/protease-market> (accessed Feb. 02, 2023).
- [2] M. Naveed, F. Nadeem, T. Mehmood, M. Bilal, Z. Anwar, and F. Amjad, "Protease—A

Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review," *Catal. Letters*, vol. 151, no. 2, pp. 307–323, Feb. 2021, doi: 10.1007/s10562-020-03316-7.

- [3] S. Raveendran et al., "Applications of microbial enzymes in food industry," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 56, no. 1. University of Zagreb, pp. 16–30, 2018. doi: 10.17113/ftb.56.01.18.5491.
- [4] A. Razzaq et al., "Microbial proteases applications," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, no. JUN. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110.
- [5] R. Melliawati and N. Rahmani, "Potensial Penghasil Enzim Protease Dari Taman," pp. 73–82, 2016.
- [6] M. N. Isda, Elvianis, and S. Fatonah, "Karakterisasi dan penapisan enzim protease, amilase, serta selulase isolat kapang filoplan *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.," *J. Biol. Univ. Andalas*, vol. 9, no. 2, pp. 54–59, 2021,

- doi: 10.25077/jbioua.9.2.54-59.2021.
- [7] N. Thakur, M. Goyal, S. Sharma, and D. Kumar, "Proteases: Industrial Applications and Approaches used in Strain Improvement," no. January, 2019, [Online]. Available: www.researchtrend.net
- [8] S. Suharti, M. T. Riesmi, A. Hidayati, U. F. Zuhriyah, S. Wonorahardjo, and E. Susanti, "Enzymatic dehairing of goat skin using keratinase from bacillus sp. MD24, a newly isolated soil bacterium," *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 1449–1461, 2018.
- [9] A. Al Mamun, M. Mian, M. Saifuddin, S. N. Khan, and M. Hoq, "Optimization of fermenting medium by statistical method for production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* MZK05M9," *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, vol. 5, no. 6, pp. 24–28, 2017, doi: 10.7324/jabb.2017.50604.
- [10] T. Tesfaye, B. Sithole, and D. Ramjugernath, "Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route—current status and future prospects," *Clean Technol. Environ. Policy*, vol. 19, no. 10, pp. 2363–2378, 2017, doi: 10.1007/s10098-017-1443-9.
- [11] Sumardi, R. Agustrina, C. N. Ekowati, and Y. S. Pasaribu, "Characterization of protease from bacillus sp. on medium containing FeCl₃ exposed to magnetic field 0.2 mt," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 130, no. 1, pp. 0–12, 2018, doi: 10.1088/1755-1315/130/1/012046.
- [12] P. Yu, X. Huang, Q. Ren, and X. Wang, "Purification and characterization of a H₂O₂-tolerant alkaline protease from *Bacillus* sp. ZJ1502, a newly isolated strain from fermented bean curd," *Food Chem.*, vol. 274, no. September 2018, pp. 510–517, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.013.
- [13] P. Kshetri et al., "Valorization of chicken feather waste into bioactive keratin hydrolysate by a newly purified keratinase from *Bacillus* sp. RCM-SSR-102," *J. Environ. Manage.*, vol. 273, no. July, p. 111195, 2020, doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111195.
- [14] A. Avci, S. Demir, and F. A. Akçay, "Production, properties and some applications of protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. EBTA6," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 51, no. 8, pp. 803–810, 2021, doi: 10.1080/10826068.2020.1858429.
- [15] J. Furhan, N. Salaria, N. Jabeen, and J. Qadri, "Partial Purification and Characterisation of Cold-Active Metalloprotease By *Bacillus* sp. AP1 From Apharwat Peak, Kashmir," *Pak. J. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 47–54, 2019, doi: 2312-7791 www.pjbt.org <http://doi.org/10.34016/pjbt.2019.16.1.8>.
- [16] S. M. Smith, R. Balasubramanian, and A. C. Rosenzweig, "Metal reconstitution of particulate methane Monooxygenase and heterologous expression of the pmoB subunit," *Methods Enzymol.*, vol. 495, pp. 195–210, 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-386905-0.00013-9.
- [17] L. Anna, J. Balázs, S. É. V., T. Enikő, and Bezúr László, "Beyond Chelation: EDTA Tightly Binds Taq DNA Polymerase, MutT and dUTPase and Directly Inhibits dNTPase Activity," *Biomolecules*, vol. 6, no. 621, pp. 1–19, 2019, doi: doi:10.3390/biom9100621.
- [18] "Effects plots for Analyze Factorial Design - Minitab." <https://support.minitab.com/en-us/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/> (accessed Jul. 06, 2023).
- [19] D. A. Goda, A. R. Bassiouny, N. M. Abdel Monem, N. A. Soliman, and Y. R. Abdel Fattah, "Effective multi-functional biotechnological applications of protease/keratinase enzyme produced by new Egyptian isolate (*Laceyella sacchari* YNDH)," *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 18, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s43141-020-00037-7.
- [20] J. S. Bhavikatti, S. M. Bodducharl, R. S. Kamagond, and S. V. Desai, "Statistical optimisation of protease production using a freshwater bacterium *Chryseobacterium cucumeris* SARJS - 2 for multiple industrial applications," *3 Biotech*, vol. 10, no. 6, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1007/s13205-020-02259-5.
- [21] A. Kusumaningrum, I. B. Wayan Gunam, and I. M. Mahaputra Wijaya, "Optimasi Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Endoglukanase menggunakan Response Surface Methodology (RSM)," *J. Rekayasa Dan Manaj. Agroindustri*, vol. 7, no. 2, p. 243, 2019, doi: 10.24843/jrma.2019.v07.i02.p08.