

PENGGUNAAN ENZIM PROTEASE NON KOLAGEN DARI PANKREAS,
PEPAYA, NENAS, OROPON DAN MIKROBA UNTUK
BATING AGENT PADA PROSES TEKNOLOGI
PENGOLAHAN KULIT

Setiyono¹, Sujadi², Lies Mira Yusiati¹ dan Jamhari¹

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan enzim protease non kolagen dari pankreas, pepaya, nenas, oropon dan mikroba untuk *bating agent* pada proses Teknologi Pengolahan Kulit. Penelitian meliputi: isolasi, uji aktivitas dan pengukuran unit enzim protease dari pankreas, pepaya, nenas, oropon dan mikroba, uji *bio-assay* pada proses penyamakan kulit. Enzim protease diisolasi dari pankreas segar, buah pepaya muda, buah nenas muda, oropon dan bakteri Genus *Bacillus* sp. menggunakan cara presipitasi dengan amonium sulfat kering. Uji aktivitas dan unit enzim dengan metode Malathy dan Chakraborty (1991) *Bio-assay* method sesuai dengan pengujian Standar Industri Indonesia (SII). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi mikroba didapat bakteri berbentuk batang, gram positif penghasil enzim protease ekstraselular pH 6,0 - 9,5 suhu 37°C isolasi enzim protease dengan konsentrasi amonium sulfat 70% menghasilkan aktivitas proteolitik pada presipitas tertinggi bila dengan kadar 60% dan 50%. Pengujian aktivitas dan unit enzim menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$). Unit enzim tertinggi diperoleh dari oropon (1564 ± 72) diikuti enzim yang berasal dari pankreas sapi (1525 ± 93), enzim yang berasal dari mikroba (977 ± 53) enzim yang berasal dari nenas (933 ± 43) dan terendah adalah enzim yang berasal dari pepaya (765 ± 84). Hasil pengujian *bioassay* enzim yang berasal dari pepaya, nenas, mikroba, pankreas dan oropon dapat digunakan untuk *bating agent*, enzim dari pepaya dengan konsentrasi 2%, enzim dari nenas 1,5% enzim dari pankreas dan mikroba (*Bacillus* sp.) 1,0% (b/b), berdasarkan kekuatan tarik dan persen kemulurannya.

(Kata kunci: Protease, *Bating agent*, Mikroba, Pengolahan Kulit.)

Buletin Peternakan 18: 127-134, 1994

¹ Fakultas Peternakan UGM, Yogyakarta 55281

² Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta 55281

**THE UTILIZATION OF NON COLLAGEN PROTEASE ENZYME
FROM PANCREAS GLAND, PAPAYA, PINE APPLE JUICE,
OROPON AND MICROBA FOR BATING AGENT IN
THE TECHNOLOGY OF LEATHER PROCESSING**

ABSTRACT

The experiment was designed to investigate the utilization of non collagen protease enzyme made from pancreas glands, papaya, pineapple juice, oropon and microbe as a bating agent in the technology of leather processing. The observation was involving of isolation, enzyme activity test, and protease enzyme unit resulted from pancreas glands, papaya, pineapple juice, oropon and microba, bioassay test in the leather processing. The pancreatic was isolated from fresh pancreas glands, green papaya, green pineapple, oropon and microbe of *Bacillus* sp. genus by using a precipitated with crystalic ammonium sulphate. The enzyme activity and enzyme unit was measured according to Malathi and Chakraborty methods, while the bioassay by using an Indonesia Industrial Standard). The results indicated that the microbia isolation was obtained the bacteria in steam formation, positive gram as a protease extracellular with pH of 6.0 - 9.5 at 37°C, 70% ammonium sulphate concentration resulted the best precipitated in enzyme isolated than the other 60% and 50% concentration and differed significantly ($P < 0.01$) on enzyme activity and enzyme unit, respectively. The highest enzyme unit was obtained in oropon (1564 ± 72), followed by cow pancreas glands (1525 ± 93), microbial enzyme (977 ± 53), pineapple enzyme (933 ± 43), and the lowest was papaya enzyme (765 ± 84). Based on bioassay test it was resulted that enzyme made from papaya, pineapple, microbe, pancreas glands and oropon was usable as a bating agent with its concentration of 2% for papaya, 1.5% for pineapple, and 1.0% for pancreas glands and microbial (*Bacillus* sp) enzyme (w/w) respectively according to its tensile strength and stretch-at break tests.

(Key Words: Protease, Bating agent, Microbe, Leather processing.)

Pendahuluan

Sampai saat ini perusahaan penyamakan kulit di Indonesia dalam proses bating menggunakan agensia bating yang disebut oropon, enzylon dan sebagainya, yang kesemuanya masih mengimpor. Pada agensia bating tersebut terkandung enzim proteolitik yaitu tripsin, khemotripsin (BPK, 1972). Tripsin ini sangat diperlukan untuk proses bating dalam mencerna protein protein kulit yang tidak diperlukan dalam proses penyamakan kulit, terutama protein-protein

globula, sehingga membuka ikatan protein-protein fibrus yang adadi dalam kulit (O'Flaherty *et al.*, 1956 (Mann, 1960), akan tetapi penyediaan *bating agent* dari pankreas ini terutama agensia impor dirasa masih kurang di dalam mencukupi industri penyamakan kulit skala besar.

Enzim bromelin yang terdapat dalam sari batang (*juice steam*) disebut bromelin batang, sedangkan dalam sari buah (*fruit juice*) disebut bromelin buah dengan No. EC 3.4.5.24 (Murachi, 1970). Enzim bromelin adalah glikoprotein yang

mempunyai satu bagian oligosakarida, tiap molekul yang dihubungkan dengan ikatan kovalen. Pada rantai peptida bromelin batang terdiri dari beberapa protease yang aktivitas masing-masing berbeda terhadap substrat yang berbeda berdasarkan pH substrat yang dihidrolisis ternyata bromelin batang merupakan campuran dari empat macam protease dua diantaranya yaitu pH 4,5 dan pH 5,5, ternyata memiliki sifat yang sama yaitu memutuskan ikatan peptida pada gelatin.

Menurut perjanjian Internasional 1 unit enzim adalah sejumlah enzim yang menyebabkan transformasi satu molekul (10^6 mole) substrat per menit pada suhu 25°C dalam keadaan optimum (Wirahadikusumah, 1981), sedangkan BASF (1977) menyatakan bahwa 1 unit enzim adalah sejumlah gram agensia bating yang dapat menghidrolisis atau mencerna 1,275 mg kasein.

Berbagai *Bacillus sp* mengeluarkan endoprotease serin ke dalam medium. Enzim ini mempunyai pH optimum 8,5 sampai 10,0. Setelah tahap penapisan dan pemurnian bakteri, produksi protease dapat dinaikkan dengan (i) Mutasi: dari berbagai mutan diharap ada yang bermutasi pada gene regulator atau daerah operator sehingga ekspresinya konstitutif. Apabila mutasinya pada promoter dan mengubah satuan non konsensus menjadi konsensus akan dinaikkan ekspresinya; (ii) Menaikkan jumlah kopigene secara rekayasa genetik. Cara kedua ini memerlukan teknologi tinggi tetapi pengendaliannya lebih menentu. Dalam hal ini gene penghasil protease diklon pada vektor ekspresi, seperti pUC, sehingga ekspresinya dikendalikan oleh promoter lac UV yang terdapat pada vektor. Ekspresi ini dapat diinduksi dengan penambahan *induce gratuitous* seperti IPTG. Dilaporkan dengan cara ini dapat diperoleh sekitar 20% dari protein yang dikehendaki (Sambrook *et al.*, 1989). Tsuchiya *et al.* (1991) melaporkan bahwa protease dari *Thermoactinomyces*

HS682 menunjukkan ukurannya sekitar 25.000 kD. Kekuatan kulit terutama dipengaruhi oleh kadar protein yang ada di dalam kulit, dan struktur jaringan kulit, yaitu bentuk anyaman kepadatan berkas-berkas serabut kolagen (Djojowidagdo, 1981).

Dari uraian di atas perlu diadakan penelitian tentang produksi enzim protease mikroba hasil kloning gen serta tanaman sebagai bating agent pada proses penyamakan kulit, selanjutnya pemisahan, pemurnian dan penentuan zat pembawa untuk memproduksi enzim secara komersial sebagai bating agent (Old dan Primorse, 1987).

Materi dan Metode

Isolasi bakteri penghasil protease

Metode isolasi yang digunakan adalah *screening random*. Kornet ditambah air didiamkan tersebar selama 2 hari. Disuspensikan sejumlah kornet yang telah terkontaminasi dengan air steril. Diambil 100 ul diratakan pada agar skim milk (skim milk 10 g, bacto agar 195 g, H₂O steril 100 ml). Diinkubasikan semalam pada suhu 37°C . Hasil seluruh permukaan *plate* ditumbuhi oleh mikroba, beberapa diantaranya seperti jamur, maka akan timbul tetesan bening pada uji lebih lanjut. Tetesan tersebut hidup pada Lumen Broth, tetapi tidak tumbuh pada agar skim milk. Bakteri, jamur penghasil protease akan menggunakan skim milk sehingga disekitar koloni menjadi jernih. *Bacillus subtilis* harus dimurnikan lebih dulu karena ada kemungkinan telah terkontaminasi oleh *E. coli*.

Isolasi enzim proteolitik berasal dari pankreas pepaya, nenas, mikroba dan oropon dengan cara presipitasi dengan menggunakan amonium sulfat dalam bentuk kering: 50%, 60% dan 70%, suhu 40°C pH

9,0 (Whitaker, 1972; Copper, 1977).

Isolasi enzim pankreas

Pankreas diambil dari ternak yang sudah dipotong ditempatkan dalam termos dingin (diberi es batu) dibawa ke laboratorium untuk dibersihkan dari sisa lemak, dicacah. Sampel diambil dan diuji aktivitasnya. Ternak dicatat umur, berat hidup, berat pankreas serta berat sampel. Pankreas dari 10 ekor sapi jantan umur berkisar antara 1,0 - 1,5 tahun, masing-masing sapi dibuat duplo. Kemudian diekstraksi dengan menggunakan amonium sulfat 50%, 60% dan 70%, suhu 40°C dengan pH 9,0.

Isolasi enzim nenas dan pepaya

Diambil sampel dari buah pepaya yang masih muda dan buah nenas yang masih muda, kemudian masing-masing diblender. Enzim buah tersebut dipisahkan dengan menggunakan Amonium sulfat. Identifikasi buah meliputi diameter, panjang dan beratnya. Isolasi enzim yang berasal dari buah nenas dan pepaya menggunakan amonium sulfat 50%, 60% dan 70%, suhu 40°C, pH 9,0.

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan metode *Production of alkaline Protease* (Malathi dan Chakraborty, 1991). Aktivitas enzim diukur terhadap peruraian kasein pada 1 ml larutan kasein (35%) ditambah 1,9 ml buffer glisin-NaOH (0,1 M), pH 9,5 dan 0,1 ml enzim. Campuran ini diinkubasi pada suhu 42°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambah 2 ml larutan asam triklorasetat 5% dan dilakukan analisis blanko. Tabung dидiamkan pada suhu kamar selama 30 menit dan larutan disaring pada kertas Whatman No. 13 OD. Bahan terlarut pada asam triklorasetat dibaca pada spektrofotometer UVI pada 280 nm dan dibandingkan dengan baku terosin. 1 unit enzim adalah jumlah enzim yang diperlukan

untuk menghasikan 1 mg terosin.

Bioassay uji fisik kulit

Bioassay enzim yang berasal dari pepaya, nenas, mikroba, pankreas dan oropon dilakukan pada proses bating (penyamakan kulit) dengan menggunakan kulit kambing Peternakan Etawah (PE), yang dilakukan di Balai Besar Penelitian Kulit dan Plastik, Yogyakarta. Parameter yang diuji adalah kekuatan tarik dan kemuluran sebagai standar kulit samak menurut Standar Industri Indonesia (SII).

Sampel diambil dari bagian krupon terletak 5 cm dari kiri dan kanan serta garis punggung dengan asumsi bahwa sifat fisik di daerah ini hampir seragam. Contoh kulit diuji dengan menggunakan pesawat *Tensile strength tester* atau pesawat penarik dengan jarak jepitan 5 cm. Pada pesawat ini terdapat dua skala yang masing-masing menunjukkan berat kekuatan tarik dan angka pertambahan panjang sampai putus. Hasil pengujian kekuatan tarik dinyatakan sebagai kg/cm², sedangkan kemuluran dari panjang kulit dinyatakan dalam persen.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi mikroba dengan metode *screening random* didapatkan hasil sebagai berikut: bakteri berbentuk batang, dengan pengecatan gram didapat gram positif, penghasil enzim protease ekstraselular, hidup pada suasana aerobik, mempunyai kisaran pH 6,0 - 9,5 temperatur optimum 37°C. Hasil ini mempunyai persamaan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Malathi dan Cakraborty (1991) mikroba penghasil alkaline protease.

Isolasi enzim proteolitik dengan menggunakan amonium sulfat kering karena sifatnya mudah larut dan tidak

TABEL 1. AKTIVITAS PROTEOLITIK ENZIM BERASAL DARI PANKREAS, PEPAYA, NENAS, OROPON, MIKROBA PADA PRESIPITAT DAN FILTRAT

Asal enzim proteolitik	Konsentrasi Amonium sulfat (%)	Presipitat (ug/menit)	Filtrat (ug/menit)
Pankreas	50	2754,68	8,27
	60	2975,85	2,85
	70	3284,54	-
Pepaya	50	2486,75	6,35
	60	2643,86	1,37
	70	2968,45	-
Nenas	50	2578,35	7,15
	60	2684,86	1,86
	70	3095,84	-
Oropon	50	2863,25	8,98
	60	3074,65	2,36
	70	3386,89	-
Mikroba	50	2695,83	7,76
	60	2896,74	1,96
	70	3268,38	-

mempengaruhi protein enzim dan untuk menentukan konsentrasi amonium sulfat yang tepat sehingga protein enzim dapat dipresipitasi seluruhnya, diperoleh hasil terhadap aktivitas enzim negatif pada filtrat dan maksimum pada presipitat, dilihat dari Tabel 1 maka aktivitas enzim proteolitik berasal dari pankreas pepaya, nenas, oropon, mikroba, paling tinggi pada konsentrasi amonium sulfat 70% (b/v). Hal ini sesuai dengan pendapat Chairunisa (1987) yang mengatakan bahwa isolasi bromelin kasar yang merupakan enzim proteolitik dengan menggunakan amonium sulfat kering diperoleh hasil optimum 70% (b/v) pada suhu 40°C pH 6,0. Dengan demikian untuk

mengisolasi enzim proteolitik tersebut digunakan amonium sulfat kering dengan konsentrasi 70%.

Hasil penelitian dapat diketahui bahwa enzim yang berasal dari pepaya, nenas dan mikrobia mempunyai kekuatan enzim yang lebih rendah dari enzim yang berasal dari oropon dan pankreas ($P < 0.01$). Aktivitas enzim yang diukur dari unit enzimnya menunjukkan bahwa enzim protease yang berasal dari oropon mempunyai aktivitas enzim tinggi yang diikuti enzim yang berasal dari pankreas, mikroba, nenas dan pepaya (Tabel 2). Hal ini disebabkan karena enzim di dalam oropon mempunyai kemampuan yang

TABEL 2. UNIT ENZIM YANG BERASAL DARI PEPAYA, NENAS, MIKROBA, PANKREAS DAN OROPON (UE)^a

Ulangan	Pepaya	Nenas	Mikroba	Pankreas	Oropon
1	683	915	875	1465	1675
2	765	898	938	1376	1463
3	678	1025	965	1685	1585
4	855	928	935	1535	1535
5	845	875	1015	1468	1648
6	771	973	1065	1635	1635
7	795	965	1025	1587	1495
8	687	910	985	1483	1487
9	675	935	988	1457	1575
10	905	910	983	1565	1548
Rerata	765 ± 84	933 ± 43	977 ± 53	1525 ± 93	1564 ± 72

^aMenurut metode *Production of Alkaline Protease* (S Malathy dan R. Chakraborty, 1991)

TABEL 3. NILAI RERATA KEKUATAN TARIK KULIT YANG DISAMAK DENGAN ENZIM YANG BERASAL DARI PEPAYA, NENAS, MIKROBA, PANKREAS DAN OROPON (kg/cm²)

Konsentrasi enzim (%)	Asal enzim					Rerata
	Pepaya	Nenas	Mikroba	Pankreas	Oropon	
0,5	293,85	196,87	234,65	213,26	220,96	231,92
1,0	255,22	212,38	239,23	216,70	191,02	222,91
1,5	217,99	198,49	188,10	182,02	167,63	190,84
2,0	202,59	171,15	160,24	161,96	148,72	168,93
Rerata	242,41	194,72	205,55	193,48	182,08	

lebih besar yang ditunjukkan oleh unit enzim yang lebih besar pula. Menurut Divakaran (1978) oropon mempunyai aktivitas optimal pada pH 8,0, sedangkan enzim-enzim yang

berasal dari mikroba (bakteri *Bacillus sp*) mempunyai aktivitas enzim optimal pada pH 9,5 (Malathy dan Chakraborty, 1991), tetapi enzim mikroba ini dapat diperbesar

TABEL 4. NILAI RERATA KEMULURAN KULIT YANG DISAMAK DENGAN ENZIM YANG BERASAL DARI PEPAYA, NENAS, MIKROBA, PANKREAS DAN OROPON (%)

Konsentrasi enzim (%)	Asal enzim				Rerata	
	Pepaya	Nenas	Mikroba	Pankreas		Oropon
0,5	41,33	54,33	66,66	58,33	56,33	53,40
1,0	49,66	57,66	59,66	61,33	61,00	57,86
1,5	51,00	58,00	56,00	58,66	63,66	57,46
2,0	58,33	61,33	61,66	61,33	65,66	61,66
Rerata	50,08	57,83	58,50	59,91	61,66	

aktivitasnya dengan rekayasa genetik (van der Land *et al.*, 1991). Selanjutnya mereka menyatakan bahwa *Bacillus sp* menghasilkan alkalin protease secara ekstraselular dan dapat dikendalikan oleh promotor Lac, untuk memperkuat ekspresi gen protease yang dikendalikan oleh promotor Lac perlu dilakukan retriaksi dan sub kloning.

Bioassay uji kualitas fisik kulit

Ditinjau dari hasil kekuatan tarik dibandingkan dengan standar SII yaitu 150 kg/cm², maka penelitian ini menunjukkan masih di atas standar. Jadi kelima enzim dapat dipergunakan dalam proses bating.

Ditinjau dari hasil kemuluran dibandingkan dengan standar SII yaitu 60%, hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim yang berasal dari pepaya menghasilkan nilai kemuluran yang masih di bawah standar, hanya pada konsentrasi 2%, nilai kemuluran dapat mendekati standar enzim-enzim yang lain bervariasi mendekati standar.

Kesimpulan

Isolasi mikroba diperoleh bakteri berbentuk batang, gram positif, penghasil enzim protease ekstraselular pH 6,0 - 9,5 temperatur optimum 37°C.

Enzim proteolitik yang berasal dari pankreas pepaya, nenas, oropon, mikroba dapat diisolasi dengan menggunakan cara presipitasi oleh amonium sulfat dengan konsentrasi 70% (b/v). Enzim yang berasal dari tanaman, yaitu pepaya dapat digunakan dalam proses bating dengan konsentrasi lebih besar dari 2% (berat/berat). Enzim yang berasal dari nenas dapat digunakan dalam proses bating dengan konsentrasi lebih dari 1,5% (berat/berat). Enzim yang berasal dari pankreas maupun bakteri dapat digunakan dalam proses bating dengan konsentrasi lebih besar 1,0% (berat/berat) berdasarkan kekuatan tarik dan persen kemulurannya.

Daftar Pustaka

- BASF, 1977. Data for Tanners. Badische Anilin and Soda Fabrik, Ludwigshfen, West Germany. Hal. 236.
- BPK, 1972. Kulit Standar Indonesia. Balai Penelitian Kulit Yogyakarta.
- Chairunnisa, H. 1987. Isolasi Enzim Bromelin kasar dari bonggol nenas. Lanjutan simposium Bio proses dalam industri pangan 12-14 Januari 1987 di Yogyakarta. PAU Pangan dan Gizi UGM dan Liberty Yogyakarta Hal: 319-325.
- Cooper, T.J., 1977. The Tools of Biochemistry A. Wiley Interscience Pub. Jon Wiley & Sons, New York, London Sydney, Toronto, Hal. 423.
- Godfrey, T.T. and J. Reichelt, 1986. Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. McMillan Publ. Ltd., New-York.
- Heinicke, R.M., and W.A. Gortner, 1957. Stem bromelin a new protease preparation from pineapple plants. Economic Botani 11: 225-234
- Malathi, S and R. Chakraberthy, 1991. Production of Alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrate fermented condition for used as a depilation agent. Applied and Environmental Microbiology 57: 712-716
- Mann, I., 1960. Rural Tanning Techniques F.A.O. Rome Marriot, N.G., G.C. Smith, Z.L. Carpenter, and T.R. Dutson, 1985. Rapid Analytical method of ground beef. J. Food Qual. 8: 153-160.
- Murachi, T., 1970. Bromelain enzymes. In: *Methods in Enzymology Protolytic Enzymes*. Pearlman, Centrade E. and Laszlo Lorand, Eds. Academic Press, New York, 273-285.
- Murachi, Takashi, Meieko Yasui, and Yoko Yasuda, 1964 Purification and Physical Characteristic of Stem Bromelain. Biochemistry 3: 48-55.
- P'Flaherty, F. W.T. Roddy, and R.M. Lollar, 1956. The Chemistry and Technology of Leather. Reinhold Publ. Co., New-York.
- Old, R.W., and P.B. Primorse, 1987. Principles of Gene Manipulation. 3rd. ed. Blackwell Scientific Publ. Oxford.
- Tsuchiya, K., Y. Nakamura, H. Sakashita, and T. Kimura, 1991. Purification and Characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *thermoactinomyces* sp. HHS682 Biosci. Biotech. Biochem. 56(2): 216-250.
- Whitaker, J.R., 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker Inc., New-York. Hal 619.
- Wirahadikusumah, M., 1981. Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat. Vol. II Institut Teknologi Bandung Bandung Hal. 40-60.