PEMBUATAN PEPTON DARI BUNGKIL KEDELAI DAN KHAMIR DENGAN ENZIM PAPAIN UNTUK MEDIA PERTUMBUHAN BAKTERI

[Peptone Production From Soybean Press Cake and Yeast By Papain Enzyme For The Bacterial Growth Media]

Fachraniah [1], Dedi Fardiaz [2], dan Tami Idiyanti [3]

[1] Mahasiswa Program Studi Ilmu Pangan PPs-IPB
[2] Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi-Fateta-IPB
[3] Puslitbang Kimia Terapan-LIPI- Serpong

ABSTRACT

Peptone can be produced from soybean press cake and yeast by enzymatic hydrolysis with papain. The activity of papain used in this experiment against casein is indicated by Vm (2000 unit) and Km (0.8%). The process condition for soybean press cake was : [S] = 3.72%, [E] = 0.4%, 60 °C, pH 6.2-6.3, 5 hours, while for yeast was [S] = 4.76%, [E] = 0.2%, 60 °C, pH 5.8-5.9, 5 hours. The yield of the hydrolysis process of soybean press cake peptone was 12.1%, while that of yeast was 18.9%. The peptone obtained was brownish yellow in color with moisture content of 3 and 5%, ash content 6 and 7 %, total protein 9 and 11%, solubility 98%, amino nitrogen 1.9 and 2.82, and AN/TN ratio = 26.47 and 27.62%, respectively. The chromatographic pattern of the peptone using gel filtration column of Superdex-75 appeared to be the same as that of the commercial soy pepton. Growth test with E. coli, S. aureus, and B. subtilis showed that soybean press cake and yeast peptone could be used as component in media for microbial growth.

Key words : *Enyzme papain, E. coli, S. aureus, B. substilis, and peptone*

PENDAHULUAN

Pepton sebagai sumber nitrogen utama dalam media komersial untuk pertumbuhan bakteri, saat ini masih diimpor dengan harga tinggi. Pepton adalah produk campuran polipeptida, dipeptida, dan asam amino, dapat dihasilkan dari bahan-bahan yang mengandung protein melalui reaksi hidrolisis asam atau enzimatis. Bungkil kedelai dan khamir merupakan limbah yang mengandung protein tinggi. Bungkil kedelai adalah sisa dari proses ekstraksi minyak kedelai dengan kadar protein sekitar 40% (Fardiaz & Yasni, 1998), sedangkan khamir adalah limbah dari industri bir dengan kadar protein sekitar 55% (Atmaka, 1997). Kedua bahan berprotein ini dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan baku pembuatan pepton yang nilai ekonominya jauh lebih tinggi.

Papain adalah protease yang dapat diperoleh dari getah pepaya. Saat ini papain sudah dapat diisolasi untuk dapat digunakan sebagai katalis dalam hidrolisis protein. Atas dasar pemanfaatan limbah dan enzim yang tersedia, penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mendapatkan teknologi proses pembuatan pepton dari bungkil kedelai dan khamir menggunakan papain. Pepton yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai campuran media pertumbuhan bakteri.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Lab. Analisis Pusat Penelitian Kimia (P2K) LIPI, PUSPIPTEK, Serpong.

Bahan utama yang digunakan adalah bungkil kedelai yang diperoleh dari LIPI Bandung, endapan khamir dari pabrik Bir PT Multi Bintang Indonesia Jakarta, sedangkan enzim papain kasar dihasilkan di P2K, LIPI, Serpong. Baktri uji yaitu *E. coli, S. aureus,* dan *B. subtilis* diperoleh dari Lab. Mikrobiologi P2K LIPI Serpong. Peralatan yang digunakan antara lain Certomat WR (B Braun Biotech Int.), Sentrifus (Beckman), Spektrofotometer UV/Vis (Hitachi U-2000), Freeze-drier (Dura-Dry MP), dan Khromatografi filtrasi gel AKTA explorer (Pharmacia Biotech).

Metode

Pengujian aktivitas enzim papain dilakukan terhadap kasein 1% pada suhu 40°C selama 5 menit. roduksi pepton dilakukan pada kondisi protein terlarut optimum. Untuk menghilangkan aktivitas enzim dilakukan pemanasan pada 90°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi dan pemisahan enzim dengan ultrafiltrasi (membran 10.000da),selanjutnya permeat dikeringbekukan. Pengukuran protein terlarut dilakukan dengan

spektrofotometri (Lowry, 1951). Produk bubuk yang dihasilkan dikarakterisasi meliputi kelarutan, nilai N total dan nilai N amino (Silvestre, 1996). Pola kromatografi pepton diamati pada kolom filtrasi gel Superdex-75 dengan eluen bufer asetat pH 5.6. Efektivitas produk terhadap pertumbuhan bakteri uji dilakukan dengan mengamati % transmitans medium pertumbuhan (1 ml biakan simpanan pada 50 ml pepton 0.5 %) selama 24 jam (Susetyo, 2000). Hasil pertumbuhan tersebut dilanjutkan dengan angka lempeng total (ALT) pada medium agar nutrien (NA) dengan masa inkubasi 24 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas enzim papain

Aktivitas proteolitik papain pada subtrat kasein 1%, suhu 40 °C dan inkubasi selama 5 menit memberikan nilai 1164 unit. Unit dalam hal ini didefinisikan sebagai jumlah μg produk (tirosin) yang terbentuk per mg per menit dari substrat kasein pada kondisi di atas. Dari hasil analisis menggunakan kurva Lineweaver-Burk diperoleh karakteristik dari papain yang bersangkutan adalah Vm sebesar 2000 unit dan Km = 0.8 %.

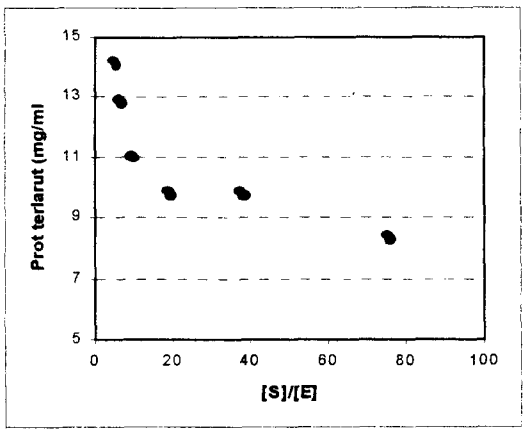
Pemilihan kondisi reaksi hidrolisis

Kondisi hidrolisis umumnya dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, suhu, pH, dan waktu (Muchtadi et al., 1992).

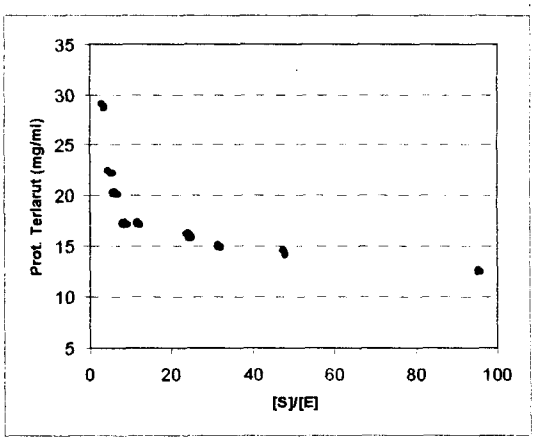
Kebutuhan banyaknya substrat bungkil kedelai dan khamir bagi enzim papain ditentukan dengan menggunakan jumlah substrat yang bervariasi antara 1 – 10% (b/v). Hidrolisis dilakukan pada konsentrasi enzim 1% dengan waktu 1 jam dan suhu 60°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi substrat bungkil kedelai 3,72% atau setara dengan 1,32 % protein bungkil kedelai sudah cukup untuk dijadikan dasar dalam produksi pepton selanjutnya, sedangkan untuk substrat khamir dibutuhkan konsentrasi 4,76% atau setara dengan 2,6% protein khamir.

Untuk masing-masing jumlah substrat maksimum di atas dilakukan hidrolisis dengan menggunakan papain pada konsentrasi di bawah 1%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa laju reaksi optimum pada proses hidrolisis bungkil kedelai cukup dibutuhkan papain dengan konsentrasi 0,4% dan menghasilkan protein terlarut sebesar 11 mg/ml, sedangkan untuk khamir cukup dibutuhkan papain dengan konsentrasi 0,2% dan menghasilkan protein terlarut sebesar 13,64 mg/ml. Hal ini diduga karena protein khamir lebih sederhana. Hubungan antara konsentrasi substrat dan enzim pada proses hidrolisis kedua substrat di atas dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Rasio konsentrasi enzim papain terhadap substrat bungkil kedelai masih dapat dilakukan pada 1 : 20 sedangkan untuk khamir masih dapat dilakukan pada rasio 1 : 30. Netto & Galeazzi (1998) melaporkan rasio enzim/substrat untuk hidrolisis isolat protein kedelai dengan pankreatin adalah 1/35 sementara Henn & Netto (1998) mengamati hidrolisis isolat protein kedelai dengan pankreatin pada rasio enzim/substrat 1/15.

Perlakuan pada beberapa kondisi suhu (40 – 80°C) menunjukkan laju hidrolisis optimum untuk bungkil kedelai dapat dicapai pada suhu 70°C sedangkan laju optimum untuk khamir adalah 60-70°C. Dapat disimpulkan bahwa suhu 60°C adalah optimum untuk kedua substrat tersebut. Papain termasuk protease yang tahan terhadap suhu tinggi. Tsumura et al., (2000) melakukan hidrolisis protein kedelai pada suhu 60 - 80°C dengan berbagai protease khususnya papain sementara Liener (1981) menyebutkan suhu optimal untuk papain adalah 50 – 60°C.



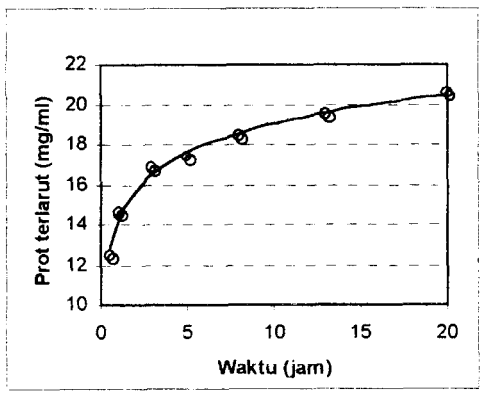
Gb. 1. Pengaruh rasio [S]/[E] pada hidrolisis bungkil oleh papain



Gb. 2. Pengaruh rasio [S]/[E] pada hidrolisis khamir kedelai oleh papain

Dari hasil percobaan pada berbagai kondisi pH awal (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0) ternyata pH optimal untuk bungkil kedelai adalah pada pH 6-8 sedangkan untuk khamir adalah 5-7. Hal ini diduga karena struktur protein kedua substrat berbeda. Papain relatif stabil di daerah pH netral, dan diamati hidrolisis protein kedelai optimum pada pH 5-8 (Cowan, 1983; Tsumura et al., 2000) sedangkan Liener (1981) menyebutkan aktivitas papain berada pada selang pH 3 sampai 11.

Hidrolisis protein bungkil kedelai dan khamir dengan papain pada kondisi optimal yang didapatkan di atas diamati masing-masing selama 20 dan 8 jam. Kurva hidrolisis ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4. Kurva hidrolisis yang dihasilkan menunjukkan kenaikan jumlah protein terlarut yang tajam pada awal reaksi sampai 5 jam, selanjutnya mulai melambat. Netto & Galeazzi (1998) mengamati kecepatan hidrolisis isolat protein kedelai dengan pankreatin, tinggi pada 4 jam pertama, selanjutnya kecepatan mulai menurun. Hal ini diduga disebabkan oleh beberapa hal, yaitu penurunan ikatan peptida yang spesifik bagi enzim (sesuai untuk aksi enzim tersebut), inhibisi produk dan inaktifasi enzim, kompetisi antara substrat asli atau protein yang tidak terhidrolisis dengan peptida yang terbentuk selama hidrolisis.



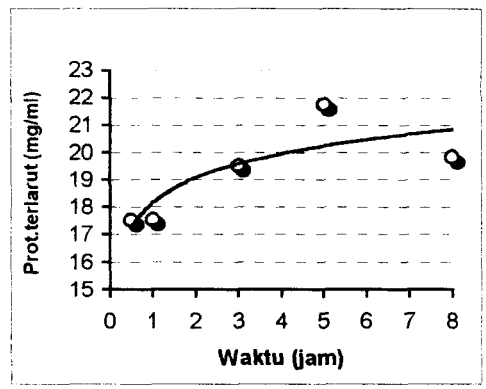
Gb. 3. Pengaruh lama waktu hidrolisis bungkil kedelai terhadap protein

Waktu hidrolisis rata-rata dari berbagai isolat protein kedelai dengan pankreatin dilaporkan berkisar dari 0,8 sampai 4,2 jam (Henn & Netto, 1998). Dilaporkan pula bahwa isolat protein kedelai dengan indeks dispersi protein lebih tinggi dan mengandung semua sub unit fraksi polipeptida yang larut air, memiliki protein *native*. Protein dengan komposisi demikian memerlukan waktu hidrolisis yang lebih panjang. Enzim mula-mula memecah protein besar ke dalam bentuk yang lebih kecil, sebagian fragmen larut, seterusnya terhidrolisis menjadi peptida yang lebih kecil. Pada tahap akhir hidrolisis protein menjadi lebih banyak terlarut. Wu et al., (1998) juga mendukung pernyataan ini dengan menyebutkan bahwa peptida dihasilkan dengan proteolisis parsial memiliki ukuran molekul yang lebih kecil dan struktur sekunder yang lebih sedikit dari protein aslinya.

Produksi pepton

Pepton diproduksi pada kondisi hidrolisis yang diperoleh sebelumnya. Untuk bungkil kedelai digunakan substrat 3,72%, enzim 0,4%, suhu 60 °C, waktu 5 jam dan pada pH sesuai dengan kondisi campuran awal (6,2-6,3). Untuk khamir digunakan substrat 4,76%, enzim 0,2%, suhu 60°C, waktu 5 jam dan pH sesuai dengan kondisi campuran awal (5,8-5,9). Rendemen produk untuk bungkil kedelai sebesar 12,1% (b/b) sedangkan untuk khamir sebesar 18,8% (b/b).

Rendemen pepton khamir lebih besar bila dibandingkan dengan pepton dari bungkil kedelai, hal ini diduga karena bentuk atau struktur protein dari kedua bahan tersebut berbeda. Netto & Galeazzi (1998) menyebutkan seringkali sulit bagi protein dalam bentuk alami (*native*) seperti protein kedelai untuk mengalami dekomposisi dengan enzim hidrolitik seperti protease. Disebutkan pula bahwa denaturasi protein dengan panas, alkohol, dll umumnya dilakukan lebih dahulu sebelum



Gb. 4. Pengaruh lama waktu hidrolisis khamir terhadap protein terlarut

diperlakukan dengan hidrolisis proteolitik. Dilaporkan protein kedelai terdiri atas 2 komponen utama, glisinin dan β-konglisinin yang memiliki bobot molekul antara 20 sampai 90 kDa (Lei et al., 1983; Romagnolo et al., 1990; Fukushima, 1991). Dilaporkan pula ikatan disulfida intermolekular yang terdapat pada glisinin akan terbuka atau putus selama hidrolisis (Lei et al., 1983). Pembukaan ikatan residu asam amino terjadi selama hidrolisis protein kedelai oleh enzim karena pemutusan ikatan peptida (Fukushima, 1991).

Khamir pada umumnya memiliki berbagai protease endogenous dengan pH dan temperatur optimum yang berbeda-beda (Kelly, 1983), sehingga papain diduga berperan membantu meningkatkan hasil akhir (rendemen) dan laju kelarutan.

Karakterisasi produk

Produk dikarakterisasi kelarutannya dalam air dan derajat hidrolisisnya melalui perbandingan nilai nitrogen amino dan nitrogen total (AN/TN). Sebagai standar digunakan *Soy peptone* dari Scharlau dan *Bacto peptone* dari Difco. Hasil ditabulasikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai kelarutan, Ntotal dan Namino pepton

Nama pepton	Kelarutan (%)	Ntotal (TN)	Namino (AN)	AN/TN(%)
Pepton bungkil kedelai	97,6	7,33	1,94	26,47
Pepton khamir	98,5	10,21	2,82	27,62
Soy pepton Scharlau	99,9	8,62	1,73	20,07
Bacto pepton Difco	99,9	13,93	1,52	10,91

Kelarutan pepton yang dihasilkan sedikit lebih rendah dibandingkan dengan pepton standar sedangkan rasio AN/TN menunjukkan hasil yang lebih besar dari soy pepton dan bacto pepton. Hal ini diduga dari tahap akhir pembentukan produk yang digunakan berbeda. Penelitian ini menggunakan membran ultrafiltrasi dengan MWCO 10.000 dalton. Untuk menghasilkan filtrat yang lebih jernih lagi dapat digunakan membran yang lebih kecil dari 10.000 dalton. Dilaporkan ultrafilter 5.000-10.000 dalton efektif untuk memisahkan semua fraksi peptida yang lebih besar (Lahl & Braun, 1994).

Nilai AN/TN pepton bungkil kedelai dan pepton khamir yang dihasilkan sedikit lebih besar bila dibandingkan dengan pepton standard. Rasio AN/TN dapat menunjukkan derajat hidrolisis (Lahl & Braun, 1994). Pepton dari kasein dan konsentrat protein *whey* dilaporkan memiliki AN/TN sebesar 24% sedangkan peptidanya masing-masing 48% dan 43% (Lahl & Braun, 1994). Quest International memproduksi *HY-Soy* dan *HY-Yest*. HY-Soy didefinisikan sebagai sumber peptida kualitas tinggi yang dihasilkan melalui hidrolisis enzimatis protein kedelai. HY-Soy memiliki nilai AN sebesar 1.9, TN 9.5, dan AN/TN sebesar 20.0%. HY-Yest didefinisikan sebagai ekstrak alami dari pertumbuhan primer khamir yang diperoleh dengan pengeringan beku. HY-Yest memiliki nilai TN 10.8 – 11.5%. Cowan (1983) melaporkan beberapa jenis pepton untuk mikrobiologis, diantaranya hidrolisis protein daging dan protein kedelai dengan papain. Nilai AN dan TN pepton daging sebesar 1.7 dan 14.5, sedangkan untuk pepton kedelai adalah 1.0 dan 10.1. Bila dibandingkan dengan beberapa hasil yang sudah dilaporkan, dapat dikatakan papain dalam hal ini cukup efektif memutuskan ikatan peptida dalam protein bungkil kedelai dan khamir menjadi produk pepton.

Pola kromatografi pepton pada kolom filtrasi gel

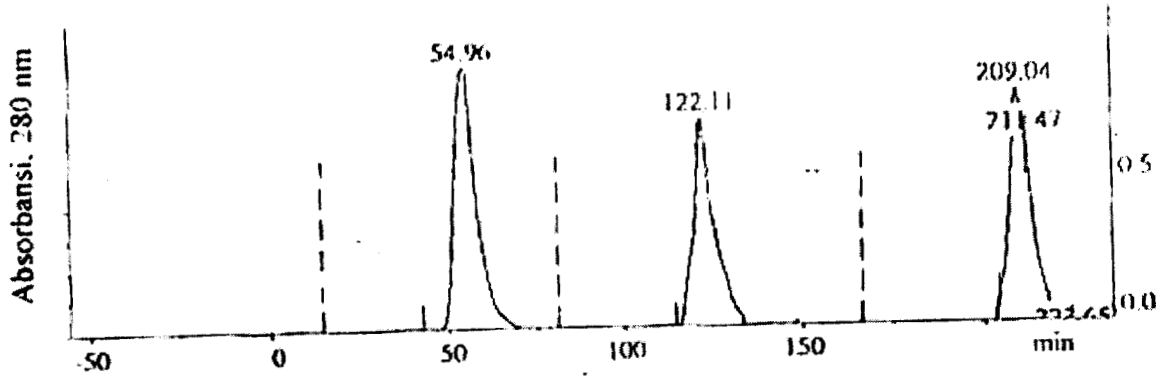
Pepton bungkil kedelai dan pepton khamir yang dihasilkan difraksinasi dengan kolom Superdex-75 (tinggi paking ± 30 cm, diameter 1,5 cm) dengan eluen bufer asetat pH 5.6. Fraksi-fraksi diamati absorbansinya pada λ 280 nm pada spektrofotometer. Pola kromatogram terlihat pada Gambar 5 dan 6. Berdasarkan data elusi tersebut disimpulkan bahwa ada 3 puncak yang muncul pada hasil hidrolisis selama 5 jam. Pola ini menguatkan dugaan bahwa pepton bungkil kedelai dan pepton khamir yang. dihasilkan dari hidrolisis 5 jam memiliki campuran peptida berbobot molekul kecil lebih banyak dibandingkan dengan proses hidrolisis 1 jam. Dengan demikian dapat disebutkan secara teoritis hidrolisis selama 5 jam dapat menghasilkan pepton yang dapat dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan bakteri.

Efektivitas pepton terhadap pertumbuhan bakteri

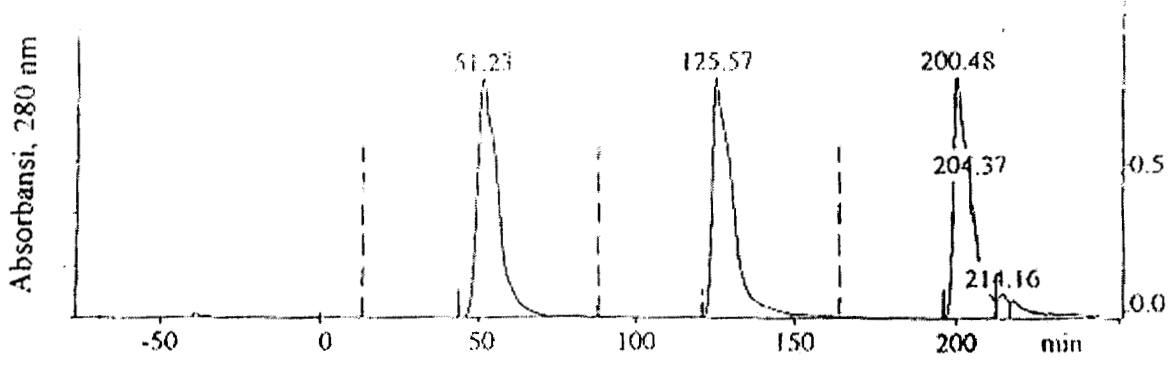
Gambar 7, 8, dan 9 masing-masing menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis*.

Dari kurva tersebut terlihat bahwa pola pertumbuhan bakteri pada media pepton bungkil kedelai mirip dengan media pepton kedelai komersial (Scharlau) sedangkan pola pertumbuhan pada media pepton khamir lebih mirip dengan bacto pepton dari Difco. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan semua bakteri uji pada media pepton yang dihasilkan dari penelitian mirip dengan media pepton komersial.

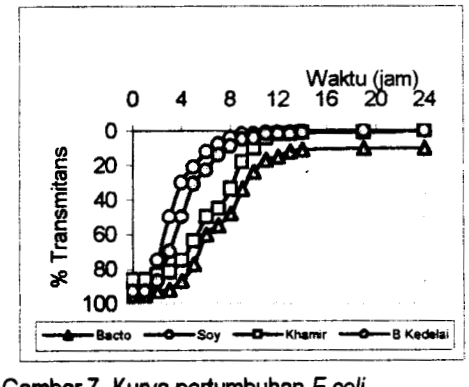
Untuk melihat kualitas pertumbuhan bakteri tersebut dilakukan penanaman (0.1 ml setiap pengenceran tertentu dari suspensi bakteri yang tumbuh 24 jam pada pepton uji) pada medium NA, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Hasil uji pertumbuhan koloni terlihat pada Gambar 10. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan semua bakteri identik satu sama lain.



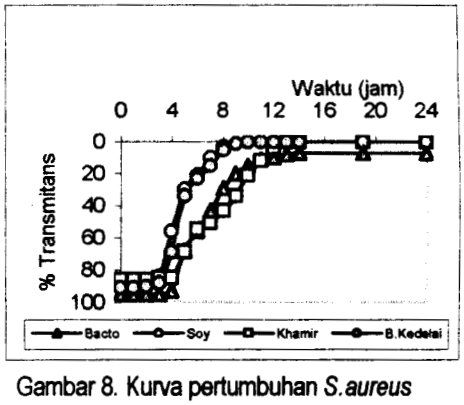
Gambar 5. Pola kromatografi pepton bungkil kedelai



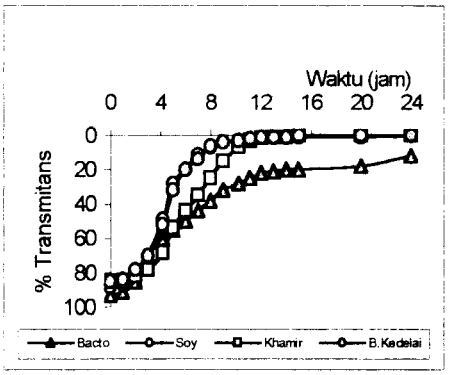
Gambar 6. Pola kromatografi pepton khamir



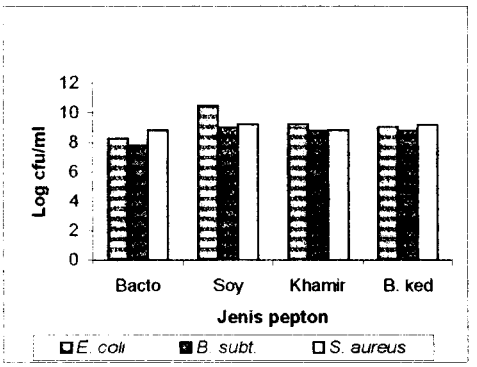
Gambar 7. Kurva pertumbuhan *E.coli* pada beberapa media pepton



Gambar 8. Kurva pertumbuhan *S.aureus* pada beberapa media pepton



Gambar. 9. Kurva pertumbuhan *B.subtilis* pada beberapa media pepton



Gambar. 10. Pertumbuhan koloni bakteri dari medium pepton pada Nutrien Agar

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Produksi pepton dari bungkil kedelai dan khamir dengan menggunakan papain kasar dapat dilakukan. Kondisi yang digunakan dalam produksi pepton dari bungkil kedelai adalah [S] = 3,72%, [E] = 0,4%, suhu 60 °C, pH sesuai campuran awal (6,2-6,3) dan waktu 5 jam, sedangkan untuk khamir adalah [S] = 4,76%, [E] = 0,2%, suhu 60 °C, pH sesuai campuran awal (5,8-5,9) dan waktu 5 jam. Pepton yang dihasilkan memiliki kualitas yang mirip dengan pepton komersial baik dalam sifat fisik dan kimia yang diujikan maupun dalam mendukung pertumbuhan bakteri.

Saran

Disarankan ada rancangan lebih lanjut untuk menentukan optimasi proses yang dikaitkan dengan keuntungan komersial.

DAFTAR PUSTAKA

Atmaka, W. 1997. Sifat-sifat fungsional konsentrat protein dari Yeast Press industri bir. Tesis. Jogyakarta: UGM.

[AOAC]. 1984. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.

Cowan, D. 1983. Protein. Di dalam Godfrey T, Reichelt J, editor. Industrial Enzymology. USA: Macmillan. hlm 352-374.

Fardiaz, D. dan Yasni, S. 1998. Produk Mutakhir Turunan Kedelai. Di dalam Prosiding Seminar Pengembangan Pengolahan dan Penggunaan Kedelai Selain Tempe. CFNS, IPB, ASA. hlm 119-127.

Fukushima, D. 1991. Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology, and nutrition. Food Reviews International. 7(3):323-351.

Henn, R.L. and Netto, F.M. 1998. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolat. J. Agric. Food Chem.46:3009-3015.

Kelly, M. 1983. Yeast Extract. Di dalam: Godfrey T, Reichelt J, editor. Industrial Enzymology. USA: Macmillan. hlm 457-465.

Lahl, W. and Braun, S.D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. Food Tech.:68-71.

Lei, M.G., Tyrell, D. , Bassette, R. and Reeck, G.R. 1983. Two dimensional electrophoretic of soybean proteins. J. Agric. Food Chem.(31): 963-968

Liener, I.E. 1981. The Sulfhidril Protese. Di dalam: Schimmer S.editor. Source Book of Enzymology. USA. AVI and Handbook Series.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin fenol reagent. J. Biol. Chem. 193:65-270.

Muchtadi, D., Palupi ,N.S. dan Astawan, M. 1992. Enzim Dalam Industri Pangan. PAU IPB.

Netto, F.M. and Galeazzi, M.A.M. 1998. Production and characterization of enzymatic hydrolysates from soy protein isolat. Iwt. 3:624–631.

Romagnolo, D., Polan, C.E., and Barbeau, W.E. 1990. Degradasi of soybean meal protein fractions as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Dairy Sci 7(9):2379-2385.

Silvestre, M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. Food Chem. 60(2):263-271.

Susetyo, A.R. 2000. Isolasi Pepton Secara Ekstraksi Enzimatis Menggunakan Limbah Perikanan. Skripsi. Fateta. Bogor.

Tsumura, penemu: 3 Oktober 2000. US Patent 6,126,973.

Wu WU, Hettiarachchy, N.S. and Qi M. 1998. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. JAOCS 75(7):845-850.